



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

Establecimiento del banco de germoplasma *in vitro* de *Dioscorea* sp.

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Yayfré José Reina Cumarín como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Biología

Tutora: Dra. Maira Oropeza

CARACAS, VENEZUELA

Abril del 2018

DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE

Br. Yayfré José Reina Cumarín

Quienes suscribimos, los miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br Yayfré José Reina Cumarín, CI: 15.527.588, titulado "Establecimiento del banco de germoplasma *in vitro* de *Dioscorea* sp." para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos APROBADO, con una calificación de 20 puntos, CON () SIN () MENCIÓN HONORIFICA

Para dar fe de ello, se levanta la presente acta en Caracas, a los 20 días del mes de abril del 2018.

Dra. Maira Oropeza
Tutora



Dra: Iselen Trujillo
Jurado

Dra: Teresa Edith Vargas
Jurado



Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología
Dirección

CONSTANCIA

El Consejo de la Escuela de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, certifica que en su sesión del día 02/05/2018, acordó otorgar la **Mención Honorífica** al Trabajo Especial de Grado de la bachiller **Reina C., Yayfré J.**, titular de la cédula de identidad No. 15.527.588; titulado: "**Establecimiento del banco de germoplasma *in vitro* de *Dioscorea sp.***"; considerando la originalidad, independencia y creatividad en la elaboración del mismo, así como la sobresaliente calidad del trabajo escrito y la presentación oral.

Constancia que se expide a petición de la parte interesada a los siete días del mes de mayo del año dos mil dieciocho.



Prof. Fernando González
Director (Encargado)

/br.-

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecerle primeramente a mi Dios Padre por haberme guiado a lo largo de este camino y dado la sabiduría necesaria para culminar de manera satisfactoria mi Trabajo Especial de Grado. A mis padres José Alfredo y Yanauria por el apoyo incondicional en cada momento, por esos consejos y palabras de aliento cuando más las necesite, de verdad gracias y este nuevo logro es por y para uds. los amo infinitamente. A mis hermanos Yayna y Miguel Alfredo quienes a pesar de la distancia siempre estuvieron presentes en cada paso que di.

Agradezco también a mi prima Hortensia, quien me recibió en su hogar y me adoptó con una hija y estuvo pendiente apoyándome en cada instante. A mis primas Mariana y Mari Ale que se convirtieron en mis hermanitas, gracias por esas palabras de estímulo de seguir siempre hacia adelante. A Alejandro mi novio hermoso, quien llegó a mi vida en el momento preciso, gracias por todo tu amor, paciencia, comprensión y esas palabras de aliento durante los últimos días de la tesis mi amor, y por acompañarme de una forma especial a pesar de la distancia.

Agradezco a mis Angeles mi abuela Rosa Eusebia y mis tías Leonidas y Liduvina y a mi padrino Euclides que aunque ya no están físicamente conmigo, creyeron en mí y me alentaron a seguir siempre hacia adelante. A mis tías Lila, Emilia y Bianey y mis primas Ney y Neysa gracias por estar pendiente de mí las quiero, de igual forma a todos mis demás familiares uds saben que los quiero y disculpen por no nombrarlos a todos.

Gracias infinitas para mí Tutora, la Dra. Maira Oropeza por haberme recibido en su laboratorio y dado el asesoramiento y apoyo incondicional en este trabajo, gracias también por haberme brindado su amistad, cariño y confianza, y por todos esos sabios consejos.

A mi jurado, las Dras. Edith Vargas e Iselen Trujillo gracias por haber aceptado leer mis manuscritos y por todo su tiempo que dedicaron para realizar las observaciones y correcciones.

Mi gratitud también hacia al Dr. Wilmer Tezara por todo el asesoramiento en los análisis estadísticos de este trabajo.

Gracias a la Corporación para el Desarrollo de la Ciencia y Tecnología (CODECYT) por el financiamiento de este trabajo.

Mis agradecimientos hacia los profesores de las escuelas de Biología, Física, matemática y química en general quienes me brindaron sus conocimientos y me ayudaron a confiar en mis capacidades.

Al personal de la biblioteca Alonso Gamero y al personal de la bolsa del libro muchas gracias por toda su colaboración en los préstamos de libros y por todo el cariño y ayuda que recibí de parte de uds.

No puede faltar mi gratitud hacia todos mis amigos que estuvieron pendientes de mí en este camino, de verdad gracias por todo el cariño y apoyo que recibí de uds. especialmente de Danelys, Eubelys, Javier, Kamel y Yalitza.

A mi amigo Daniel Gomes y demás amigos del Cafetín gracias totales los quiero mucho y los llevo en mi corazón y disculpen que no los nombro a todos son muchos.

A mis amigos del LMV que ya no están: Rudy, Raiza, Beatriz, Ingrid, Mayelí, Mary Carmen, Maybeling, Ana Karina, Sandra, Francesca y Erick de verdad muchísimas gracias por todo lo que aprendí de uds los quiero mucho.

Alguien muy importante a quien quiero expresar mis agradecimientos es a Jesús Seguías, por todo su apoyo y excelentes consejos, y por siempre estar pendiente de mí durante esta etapa. Al profesor Pío Arias por todo su apoyo y todo el tiempo que me dedico para asesorarme Matemáticas III siendo de la cátedra de Física de verdad gracias, a demás por toda su amistad y cariño.

A todos muchas Gracias.

RESUMEN

El género *Dioscorea* está compuesto por más de 600 especies de las cuales sólo 12 son utilizadas con fines comerciales (Bustamante y col., 2003). En Venezuela el ñame es considerado como un recurso alimentario importante, y constituye una fuente de trabajo para pequeños productores. Dada la importancia de este cultivo, el establecimiento y caracterización de un banco de germoplasma *in vitro* de las variedades de ñame venezolanas permitirá la conservación de la diversidad de esta especie y la identificación de estas variedades. Para esto, en el presente trabajo se estableció la micropropagación y organogénesis de 6 clones de ñame (D2, D7, D8, D11, Clon colombiano (CC) y clon venezolano (CV)) donados por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA, Miranda) y se aplicaron descriptores morfológicos y marcadores moleculares (RAPD) para la identificación de estos 6 clones (Royero y col., 2007; Moreno, 2016; Demeke y col., 1996).

Los resultados muestran que la micropropagación resultó ser el mejor método para la regeneración *in vitro*, en donde se obtuvo el mayor número de brotes y un enraizamiento profuso. Para el mantenimiento de los clones de ñame en el banco de germoplasma *in vitro*, se recomienda el uso del medio de cultivo compuesto por 1/5 de las sales MS. Para la caracterización morfológica se tomaron en cuenta los descriptores más discriminativos para este género, observándose que muchos clones comparten características, en donde el clon D11 comparte un mayor número de características morfológicas con los clones D7, D8, CV y CC. La caracterización molecular arrojó 8,8% de polimorfismo; los iniciadores OPA 02 y OPA 07, permiten diferenciar todos los clones de ñame analizados, por lo que se recomienda su uso para la identificación de las variedades y especies de ñame existentes en el país.

Con estos resultados se elaboraron “Cartillas de Presentación”, donde se destaca la caracterización morfológica y molecular y la conservación *in vitro* de cada uno de estos clones. Los resultados obtenidos en la presente investigación permitieron la conservación y resguardo de la biodiversidad del ñame, bajo condiciones controladas y asépticas; y la identificación precisa de cada variedad analizada.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, *Dioscorea*, descriptores morfológicos, marcadores moleculares, banco de germoplasma.

ÍNDICE

	Número de página
1)INTRODUCCIÓN	1
2) ANTECEDENTES	3
2.1) El Ñame (<i>Dioscorea</i> sp.)	3
2.1.1) Origen y Evolución	3
2.1.2) Distribución geográfica y diversidad genética	4
2.1.3) Taxonomía	4
2.1.4) Características morfológicas de las plantas de ñame	5
2.2) Importancia económica del ñame	8
2.3) Cultivo convencional del ñame	10
2.4) Cultivo <i>in vitro</i> de ñame	11
2.4.1) Micropropagación	12
2.4.2) Organogénesis	15
2.4.3) Micropropagación y organogénesis en <i>Dioscorea</i> sp.	16
2.5) Bancos de germoplasma	22
2.6) Bancos de germoplasma de <i>Dioscorea</i> sp.	22
2.7) Descriptores morfológicos	24
2.8) Caracterización molecular	27
2.9) Antecedentes relacionados con la caracterización morfológica y molecular de <i>Dioscorea</i> sp.	30
3) OBJETIVOS	36
3.1) GENERAL	36
3.2) ESPECÍFICOS	36
4) MATERIALES Y MÉTODOS	37
4.1.) Establecimiento <i>in vitro</i> de las plantas que se utilizarán como fuente de explante (plantel) para la micropropagación y organogénesis de los clones de ñame	37
4.2) Micropropagación de los clones de ñame (<i>Dioscorea</i> sp.)	37
4.3) Organogénesis de los clones de ñame (<i>Dioscorea</i> sp.):	38
4.4) Caracterización morfológica de seis clones de ñame	39
4.5) Análisis estadístico	40
4.6) Caracterización molecular de 6 clones de ñame cultivados <i>in vitro</i>	40

4.6.1) Extracción del ADN total	40
4.6.2) Análisis RAPD	41
4.7) Análisis general de los resultados obtenidos	42
5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
5.1) Establecimiento <i>in vitro</i> de los seis clones de ñame	43
5.2) Micropropagación de los seis clones de ñame	46
5.3) Establecimiento de la organogénesis en seis clones de ñame	52
5.4) Establecimiento del banco de germoplasma de ñame (<i>Dioscorea</i> sp.)	58
5.5) Caracterización morfológica de los seis clones de ñame del banco de germoplasma de Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.	60
5.5.1) Descriptores morfológicos relacionados con el tallo maduro.	60
5.5.2) Descriptores morfológicos relacionados con las hojas maduras.	61
5.5.3) Descriptores morfológicos relacionados con los tubérculos.	64
5.6) Estimación de la variabilidad genética de seis clones de ñame utilizando marcadores moleculares RAPD.	65
5.6.1) Aislamiento de ADN	65
5.6.2) Análisis RAPD para los seis clones de ñame.	67
5.6.3) Análisis general de los resultados obtenidos	76
6) CONCLUSIONES	83
7) FACTIBILIDAD	85
8) BIBLIOGRAFÍA	86

1) INTRODUCCIÓN

El ñame, (*Dioscorea* spp.), comprende un grupo de plantas trepadoras anuales o perennes con tubérculos subterráneos y que normalmente se propagan en forma vegetativa. Este género está compuesto por más de 600 especies de las cuales sólo 12 son utilizadas con fines comerciales, entre las cuales *Dioscorea alata* L. es la más distribuida en el mundo (Bustamante y col., 2003). Su origen se produjo en el sureste del continente asiático, y a través del tráfico de esclavos fue dispersado por las Américas (González, 2012).

El ñame junto a otras raíces y tubérculos, son productos de la exportación hacia muchos países debido a su importancia socioeconómica. Nigeria, Ghana, Costa de Marfil y otros países africanos concentran la mayor producción mundial del ñame (Aguilar, 2012), siendo Nigeria el mayor productor de ñame en todo el mundo, con una producción anual de más de 45 millones de toneladas por año (FAO, 2014).

En Venezuela este cultivo es secundario, la yuca y la papa representan los cultivos de raíces y tubérculos líderes en producción. A pesar de esto el ñame es considerado como un recurso alimentario importante, y constituye una fuente de trabajo para pequeños productores. Según las estadísticas de la FAO (2014) el volumen de producción es de 50.617 toneladas por año.

Los ñames presentan altos niveles nutricionales debido al contenido de vitaminas, proteínas, grasas y carbohidratos. El almidón, es el principal carbohidrato presente, y es indispensable e importante en la seguridad alimentaria. En la industria farmacéutica el ñame también resulta ser de gran importancia y esto se debe a que algunas especies silvestres, presentan un alto contenido de alcaloides, saponinas y saponinas que son de interés para la obtención de metabolitos secundarios útiles en la medicina.

Dada la importancia de este cultivo, las técnicas de regeneración *in vitro* de *Dioscorea* permiten la producción masiva de plántulas, libres de patógenos, a bajo costo, en espacio reducido, en menor tiempo, bajo condiciones controladas, con alternativas de establecimiento de bancos de germoplasma, conservación e intercambio de material vegetal. (Bonilla, 2012). Para el establecimiento de un banco de germoplasma se deben conocer en detalle las características o atributos y posibles usos de la especie vegetal; para lo cual es preciso recurrir al estudio de atributos morfológicos, estructurales o funcionales

contenidos en el germoplasma, como portador de las características hereditarias de la especie. (Polanco, 2011).

Una caracterización morfológica se basa en el uso de manuales elaborados por instituciones científicas dedicadas a la investigación de cultivos de importancia. Los descriptores utilizados en las caracterizaciones morfológicas deben ser prácticos y de precisión, para determinar a simple vista los aspectos cualitativos y cuantitativos relevantes que deben ser evaluados en los procesos de multiplicación y regeneración (Aguilar, 2012). La caracterización molecular permite obtener una huella digital molecular de cada especie o variedad incluida en el banco de germoplasma y estimar las relaciones intra e inter específicas (Phillips, 1998).

Por todo lo antes expuesto se ha planteado en la presente investigación, establecer un banco de germoplasma de ñame y caracterizarlo a nivel morfológico y molecular.

2) ANTECEDENTES

2.1) El Ñame (*Dioscorea* sp.)

2.1.1) Origen y Evolución

El género *Dioscorea* es uno de los seis géneros pertenecientes a la familia Dioscoreaceae y agrupa aproximadamente 600 especies, de las cuales solamente doce son comestibles. Entre estas se encuentran *Dioscorea alata* (ñame blanco, amarillo y negro), *Dioscorea rotundata* (ñame portugués), *Dioscorea cayenensis* (ñame amarillo), y *Dioscorea trifida* (yampí o ñame cush-cush) (Reina y, 2012). Es un género ampliamente distribuido, engloba especies originarias de África, Asia y América, las mismas son cultivadas en regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo. Los ñames son plantas dioicas que producen tubérculos y bulbillos (tubérculos aéreos) que son de gran importancia económica (González, 2012).

Los primeros colectores alrededor de 5000 años a.c., notaron que la remoción de estos tubérculos le permitía a la planta recuperarse y producir nuevos tubérculos. La forma ancestral del ñame consistió en plantas con enraizamiento profundo y superficial. Esta última forma resultó la más adecuada para el hombre debido a su facilidad a la hora de ser cosechados (González, 2012).

El género *Dioscorea* alcanzó su distribución mundial a finales del Cretáceo, y su evolución ocurrió por separado en el viejo y nuevo mundo. Aunque el ñame tiene mayor importancia en regiones de clima tropical y subtropical, las evidencias indican que es cultivado en el mundo entero. Se plantea que los ñames se originaron en regiones forestales y que su capacidad para trepar es una adaptación a este ambiente, caracterizado por alta humedad relativa y baja radiación solar, aunque es de destacar que las especies comerciales crecen sin sombra y bajo las condiciones de humedad de los campos abiertos. Generalmente los agricultores utilizan tutores para cultivar ñame pero tanto *D. alata* como *D. rotundata* pueden desarrollarse sin este soporte (Gonzalez, 2012).

2.1.2) Distribución geográfica y diversidad genética

Según González (2003), a nivel mundial las especies utilizadas con mayor importancia en la producción para la alimentación son:

- *Dioscorea cayenensis*: Rizoma solitario de 1 a 10 kg, es generalmente grueso y ramificado. Pulpa amarilla o blanca. Se almacena mal pues tiene corto período de reposo. Tallos cilíndricos, espinosos, que se enrollan a la derecha. Hojas simples enteras, opuestas o alternas, acorazonadas. Especie muy cultivada en África Occidental y algo en América tropical; sigue en importancia mundial a *D. alata*.

- *Dioscorea alata*: Originaria del Sudeste Asiático. En la actualidad constituye la especie más cultivada en los trópicos. Con rizomas solitarios o agrupados de 2 a 4, redondos, cilíndricos, oblongos o de forma irregular, 0.40 a 1m. Algunos rizomas pueden llegar a pesar 20-30 kg. Presencia de tubérculos aéreos. Tallos fuertes alados sin espinas, verdes o púrpuras. La torsión de los tallos es en sentido contrario al movimiento de los punteros del reloj. Hojas acorazonadas, simples y opuestas.

- *Dioscorea esculenta*: Cultivada en el Sudeste de Asia y África. Rizomas pequeños de 5 a 15 cm de largo; la planta produce varios en forma de racimos, ovoides y buenos al paladar. Tallos cilíndricos, espinosos que se enrollan a la izquierda, y con hojas simples acorazonadas más pequeñas que en otras especies comestibles.

- *Dioscorea bulbifera*: Un solo rizoma por planta, blanco y globoso y un poco alargado, a veces amargo y no comestible. Tubérculos aéreos que suelen llegar a 1 ó 2 kg y que se usan como alimento. Tallo cilíndrico sin espinas, hojas simples, enteras, grandes, alternas u opuestas. Cultivada en el Sudeste de Asia, África y algo en las Islas del Pacífico y en Las Antillas.

- *Dioscorea trifida*: Originaria y cultivada en América Tropical y parte en el Sudeste de Asia. Rizomas pequeños no más de 15 cm de largo, redondos o cónicos. Pulpa blanca, amarilla o púrpura. Excelente calidad culinaria. Tallos cuadrangulares, alados y sin espinas; con torsión a la izquierda y hojas palmadas profundamente lobuladas, alternas raramente opuestas.

2.1.3) Taxonomía

Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2007) la clasificación taxonómica del ñame es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Subclase: *Liliidae*

Orden: *Liliales*

Familia: Dioscoreaceae

Género: *Dioscorea* L.

Especies: varias

Según Gonzalez (2012) El género *Dioscorea* es muy amplio y puede ser subdividido taxonómicamente en secciones como:

- a) **Enantiophyllum:** *D. rotundata*, *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. opposita* y *D. japonica*.
- b) **Combilium:** *D. esculenta*.
- c) **Osophyton:** *D. bulbifera*.
- d) **Macrogynodium:** *D. trifida*.
- e) **Lasiophyton:** *D. dumetorum*, *D. hispida* y *D. pentaphilla*.

2.1.4) Características morfológicas de las plantas de ñame

El Ñame (*Dioscorea* sp.) es una planta monocotiledónea de la familia Dioscoreaceae, cuyo órgano de reserva es conocido como tubérculo (González, 2012). La planta tiene forma de enredadera, puede tener tubérculos aéreos llamados bulbillos aéreos y tubérculos subterráneos. Estos últimos son parte útil de la planta y son utilizados tanto para el consumo como para la extracción de semilla para nuevos cultivos (Reina Y., 2012).

El tallo de la planta de ñame es parecido a una cuerda y comúnmente se denomina «bejuco». El tallo de ñame espino (*D. rotundata*), necesita un soporte donde enrollarse, mientras que otros como el ñame criollo (*D. alata*) pueden desarrollar los tallos postrados o enrollados en un soporte. Generalmente los tallos de ñame enrollan hacia la derecha en el soporte, pero hay algunos cultivares que enrollan hacia la izquierda (Peixoto y col., 2000).

Las hojas son simples, acorazonadas con márgenes lisos, el ápice es puntiagudo, no tiene pubescencia y el pecíolo es largo y alado o espinado. La base del pecíolo puede tener un par de espinas como en *D. esculenta*, o estructura en forma de oreja como en *D. bulbífera* y *D. alata* o simplemente presentar una inflamación como en el caso de *D. rotundata* y *D. cayenensis*.

El color de la hoja de ñame, dependiendo de la variedad, tiene la tonalidad verde, pero en hojas jóvenes de ñame criollo (*D. alata*) se pueden apreciar pigmentos de antocianina. La posición de las hojas en el tallo es opuesta o alterna, y en ocasiones varía en una misma planta. La combinación de la posición de la hoja con el doblamiento del pecíolo en determinado sentido expone a la lámina foliar a una máxima cantidad de luz solar (González, 2012).

El ñame se caracteriza por tener un sistema de raíces fibroso o en forma de cabellera, de crecimiento horizontal dentro de los primeros 30 cm de profundidad del suelo, aunque algunas raíces profundizan hasta 1 m. El sistema de raíces se desarrolla abundantemente en la primera etapa de la vida de la planta, o sea durante las seis semanas después de la emergencia. Independientemente del método de propagación empleado, las raíces principales brotan de una estructura llamada corno y un segundo tipo de raíces emergen del tubérculo (González, 2012).

Las plantas de ñame generalmente son dioicas, es decir, que tienen únicamente flores masculinas o plantas que solo tienen flores femeninas y como casos excepcionales se han reportado plantas monoicas; sin embargo, muchas variedades no florecen debido a la influencia del ambiente en que se desarrollan. Las flores masculinas se producen en panículas, en las axilas de las hojas; cada flor tiene tres sépalos, tres pétalos y de tres a seis estambres. La estructura de la flor presenta un color blancuzco o grisáceo que no es muy

vistoso. La flor femenina es más grande que la masculina y se da en forma de espiga en las axilas de las hojas; está conformada por tres sépalos, tres pétalos y un ovario inferior (Montaldo, 1991).

El ovario tiene tres lóculos o compartimientos, conteniendo cada uno dos óvulos. En muchas especies de *Dioscorea* las flores, para la polinización por insectos, tienen olores y producen granos de polen que son pegajosos; sin embargo, en condiciones de campo un número significativo de flores femeninas no son polinizadas, por lo cual se suceden abortos y caída de frutos jóvenes, lo que pudiera atribuirse a que las principales especies exhiben una floración irregular, a la asincronía entre las floraciones femenina y masculina, al pequeño tamaño de la flor, a que las flores están en solitario en forma de espigas y a la influencia de determinados factores, tales como la ausencia de polinizadores naturales y la práctica de establecer un solo clon en áreas pequeñas (González, 2003).

El fruto del ñame es una cápsula de 1-3 cm de largo, con tres lóculos (Monteiro y col., 2002). En la unión de los lóculos se presentan alas planas, por donde, al secar el fruto se produce la dehiscencia o abertura del fruto, para dar paso a la dispersión de la semilla. Cada lóculo contiene dos semillas, pero en el campo una o ambas pueden fallar en su germinación. La semilla es pequeña y posee alas planas para la dispersión por el viento. El cormo es una estructura que se presenta en las primeras etapas de la planta. Se localiza en la base del tallo o «bejuco» y aparece después de emitidos los primeros brotes que conformarán el follaje. Una vez desarrollado el cormo, este emitirá las raíces principales de la planta de ñame y dará origen al tubérculo; es decir, esta estructura es el punto de unión o de encuentro del tallo, del tubérculo y de las raíces. El cormo, cuando es poco desarrollado, puede permanecer adherido al tubérculo después de la cosecha, como en las especies de ñame criollo (*D. alata*) o puede ser separado del tubérculo, una vez que esté bien diferenciado, para dar origen a una nueva producción de tubérculos, como en el caso de las especies de ñame espino (*D. rotundata*) (Coursey, 1976).

Los tubérculos varían mucho en forma y tamaño, aún en la misma planta; los hay en forma esférica, fusiforme, claviforme y a menudo con ramificaciones muy cortas. La superficie es rugosa, a veces con raicillas y con tonalidades desde blancuzca a chocolate oscuro. La textura del tubérculo puede variar de suave y húmedo a áspera, seca y harinosa.

La pulpa es uniforme, compacta y varía de color blanco, amarillo hasta morado, con un sabor y apariencia característicos, después de cocido. El peso de los tubérculos está entre 300 y 400 g cada uno. El ñame espino es el más cultivado en la región de Caribe (Vidal 2010).

Debido a la alta heterocigosidad, los cultivos y clones élites son propagados vegetativamente. Para esto se emplean segmentos de tallo, bulbillos axilares y tubérculos enteros o segmentos de los mismos. Los bulbillos deben seleccionarse según el peso y clasificarse en bulbillos de primera (mayores de 80gr) bulbillos de segunda (entre 40 y 80) y bulbillos de tercera (entre 10 y 40) y realizando la plantación por separado (Gonzalez, 2012).

2.2) Importancia económica del ñame

El ñame en América tropical es cultivado por pequeños y medianos agricultores en pueblos indígenas desde la época precolombina. Constituye la mayor fuente de ingreso y empleo en muchas zonas rurales en el mundo. Antes de la introducción de otros cultivos, el ñame constituía la principal fuente de carbohidratos para los pueblos de África Occidental y Central (González, 2012).

Aunque el ñame no es muy rico en vitaminas A y C, su riqueza se debe principalmente al aporte calórico de los carbohidratos de sus tubérculos, principalmente del almidón (Aguilar y col., 2013). Además, hoy en día se han podido aislar metabolitos secundarios que son de gran importancia a nivel comercial y farmacológico dado su alto contenido en diosgenina y diocinas (Bonilla y col., 2012). La diosgenina es usada para la elaboración de cosméticos y anticonceptivos orales (González, 2012), y las diocinas son usadas para la elaboración de expectorantes, antiinflamatorios, antifúngicos y antibacterianos (Bonilla y col., 2012).

Estos cultivos hoy en día son considerados de subsistencia, y son consumidos y producidos en su mayoría por personas de muy bajos recursos económicos y pequeños agricultores. Para un futuro escenario el uso total de raíces y tubérculos en los países en desarrollo muestra un incremento proyectado de 232 millones de toneladas a 635 millones

de toneladas entre los años 1993 y el 2020, un incremento del 58%, del cual un 44% corresponderá a la yuca, 29% a la papa y 27% al camote y ñame (Scott y col., 2000).

Según las estadísticas publicadas por la organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la agricultura (FAO) en el año 2014 el ñame es cultivado por 61 países a nivel mundial, entre ellos los mayores productores de este rubro son países del continente africano ubicados en la región occidental, estos son: Nigeria, costa de marfil y Ghana. Nigeria en especial presenta un volumen de producción anual superior a los 45 millones de toneladas por año lo que representa el 70% de la producción a nivel mundial como se puede apreciar en la tabla1 (FAO, 2014).

Tabla 1. Principales países productores de ñame (*Dioscorea* sp.)

País	Producción (ton/año)
Nigeria	45.004.346
Ghana	7.119.000
Costa de Marfil	5.836.150
Etiopia	1.448.835
Cuba	399.369
Colombia	307.551
Brasil	247.000

Fuente: (FAO 2014)

En los países de Sudamérica, el ñame es de gran importancia económica para los pequeños y medianos productores debido a que es fuente de ingresos y empleos para muchas personas, además que constituye la alimentación para poblaciones rurales y urbanas. Colombia y Brasil son los principales productores de ñame en el continente Sudamericano, siendo Colombia el mayor productor con más de 300 mil de toneladas por año según la tabla 1 (FAO, 2014).

En Venezuela este cultivo es secundario, y estudios recientes han demostrado que el ñame puede ser un sustituto de la harina de trigo, ya que se han elaborado harinas con base en estos tubérculos y se han hecho productos tales como dulces, galletas, panes hasta incluso tortas; los cuales fueron presentados y aprobados por los habitantes de dos etnias del amazonas venezolano, generando a su vez un aporte nutricional importante, en

comparación a lo aportado por productos similares disponibles en los mercados locales (Cabrita, 2014).

Según reportes estadísticos de la Confederación de Asociaciones de Productores Agropecuarios (FEDEAGRO) para los años comprendidos entre 2010 y 2015 hubo una disminución paulatina en el volumen de producción, valor de la producción, superficie cosechada y rendimientos de cosechas del ñame en Venezuela (tabla 2). Esta disminución se debe a una baja en la producción de semilla certificada lo cual puede ser evidenciando en los reportes estadísticos que ofrece la FAO (2014) para los años 2010 y 2014 en donde reportan que se cosechaban un total de 5, 157 toneladas de semillas por año y 2749 toneladas de semillas por año respectivamente, lo que significa una reducción de la tasa de producción a la mitad. Por ello actualmente se están realizando investigaciones, que promuevan la producción y consumo de estos tubérculos en Venezuela (FEDEAGRO, 2015).

Tabla 2. Producción de ñame (*Dioscorea* sp.) en Venezuela

AÑOS	2010	2011	2012	2013	2014	2015
VOLUMEN DE PRODUCCIÓN (Ton. /año)	98,374	124,706	128,931	50,457	63,991	60,85
VALOR DE LA PRODUCCIÓN (Miles de Bs en 2010)	18,962	24,037	24,851	9,726	12,334	11,729
SUPERFICIE COSECHADA(HA/año))	16,814	20,314	14,354	5,261	6,949	6,369
RENDIMIENTOS KG/HA	5,851	6,139	8,982	9,591	9,209	9,554

Fuente: FEDEAGRO (2015).

Los ñames cultivados en Venezuela son principalmente *D. alata*, *D. bulbifera*, *D.cayenensis* y *D. trifida* (ñame morado). Actualmente este cultivo se realiza en los estados Bolívar, Barinas, Miranda, Carabobo, Anzoátegui, Guárico, Monagas, Yaracuy y Cojedes. El estado Miranda es el que presenta mayor superficie de cultivo (2,416 ha) (Cabrita, 2014).

2.3) Cultivo convencional del ñame

Debido a los problemas con la reproducción sexual de estas especies, las plantas de ñame son principalmente propagadas asexualmente desarrollándose a partir de tubérculos o secciones de tubérculos, pero pueden originarse también a partir de segmentos nodales, o

por bulbillos aéreos que se forman en la base de las hojas adultas y que son también tratados como semillas. El mejor tipo de semilla para su propagación, consiste en tubérculos enteros originados de la región apical, dado a la rapidez al ser comparados con otras partes. Durante la selección del material se debe considerar que el peso de la semilla debe oscilar entre 100-125 gramos para la corona y 125-200 para los centros y parte basal del tubérculo. La rapidez con la que el tubérculo de ñame rebrote, depende de la edad fisiológica del tubérculo (González, 2012).

El ñame se ve restringido por las temperaturas inferiores a 20 °C, y la planta requiere temperaturas en el rango de 25 a 30°C para exhibir un desarrollo normal. No está claro si las temperaturas que promueven el desarrollo máximo de la planta conducen a la tuberización. Los ñames requieren de suelos fértiles, profundos y de textura franca, y bien drenados. La profundidad del suelo debe ser superior a los 0,6 m, la compactación del suelo reduce el sistema radical del ñame y deforma los tubérculos. El uso de fertilizantes en ñames produce un incremento en la producción de tubérculos asociado a la fertilización nitrogenada (Rodríguez, 2000).

2.4) Cultivo *in vitro* del ñame

En el cultivo de ñame las técnicas de propagación convencional no garantizan la producción de volúmenes de material vegetal con calidad fisiológica, sanitaria y genéticas en cortos periodos de tiempo. Esto ha conllevado a que en determinados países productores del tubérculo se haya recurrido al uso de métodos biotecnológicos, como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales (González, 2012).

El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones ambientales controladas y en condiciones asépticas y libres de patógenos (Calva y col., 2005), donde se toma una porción de la planta denominada explante (como por ejemplo: el ápice, una hoja o un segmento de ella, segmento de tallo, meristemo, embrión, nudo, semilla entera, etc.) y se coloca en un medio nutritivo estéril, donde se regenerarán una o muchas plantas (Malajovich, 2006).

Estas técnicas de cultivo *in vitro* se basan en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Calva y Pérez, 2005).

Los rendimientos de ñame se ven reducidos por un complejo de enfermedades y patógenos, como por ejemplo: la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz), lesiones causadas por *Pestalotia*, *Botriodiplodia*, *Fusarium* y algunas bacteriosis. Por otra parte la producción de ñame se ha visto disminuida debido a que no se produce suficiente cantidad de semillas certificadas, por lo que el cultivo *in vitro* permite la propagación masiva de estas plantas y la obtención de semillas sanas (Malajovich, 2006).

2.4.1) Micropropagación

La micropropagación (propagación clonal por cultivo *in vitro*) constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se usa en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales (Malajovich, 2006). Consiste en el cultivo de un inóculo con potencialidad (yema, microesqueje, meristema) en un medio de cultivo nutritivo bajo condiciones asépticas.

La micropropagación presenta 5 etapas, Según George y col. (2008); estas son:

Etapa 0: Selección y preparación de la planta madre antes de comenzar la micropropagación.

Se debe prestar atención a la selección de las plantas. Puede ser ventajoso tratar la planta elegida (o partes de ella) con fungicidas, bactericidas y fertilizantes para hacer que el cultivo *in vitro* sea exitoso. Los pasos para reducir el nivel de contaminación de los explantes son considerados importantes para constituir una etapa esencial en la micropropagación. El crecimiento, la morfogénesis y las tasas de propagación *in vitro* pueden mejorarse mediante el pre tratamiento ambiental y químico apropiado de las plantas.

Etapa I: Establecimiento de un cultivo aséptico

El segundo paso en el proceso de micropropagación es seleccionar el material vegetal para obtener un cultivo aséptico. El éxito en esta etapa requiere, en primer lugar, que los explantes sean transferidos al ambiente de cultivo *in vitro*, libres de contaminantes microbianos evidentes; y que esto debe ser seguido por algún tipo de crecimiento (por ejemplo, crecimiento de una yema, o formación de callo). Por lo general, un lote de explantes se transfiere *in vitro* al mismo tiempo. Después de un corto período de incubación, se descarta cualquier recipiente que se haya encontrado que contenga explantes o medio contaminado. La etapa I se consideraría satisfactoria si un número adecuado de explantes ha sobrevivido sin contaminación.

Etapa II: La producción de nuevos brotes

El objetivo de la esta etapa es lograr la producción de nuevos brotes o propágulos de plantas que cuando se separan del cultivo, son capaces de dar origen a plantas completas (multiplicación). De acuerdo con el procedimiento *in vitro* que se esté siguiendo, la multiplicación puede producirse a partir de brotes axilares o adventicios recién obtenidos. En algunos métodos de micropropagación, esta etapa incluirá la inducción previa de centros meristemáticos a partir de los cuales pueden desarrollarse órganos adventicios. Algunos de los propágulos producidos en la Etapa II (especialmente los brotes) también pueden usarse como base para ciclos adicionales de multiplicación, ya que normalmente pueden cultivarse de nuevo (subcultivados) para aumentar su número.

Etapa III: Preparación para el crecimiento en el medio de cultivo

Los brotes o plántulas derivados de la Etapa II son muy pequeños y no son capaces de crecer en el suelo en esta etapa, por lo tanto se espera que las plántulas sean capaces de realizar fotosíntesis y de sobrevivir sin un suministro artificial de carbohidratos. Algunas plántulas necesitan ser tratadas especialmente en esta etapa para que no se vuelvan atrofiadas o inactivas cuando se sacan del ambiente de cultivo.

Etapa IV: Enraizamiento

El enraizamiento es una parte muy importante de cualquier esquema de propagación *in vitro*. Algunas especies forman raíces adventicias en los brotes durante el curso del

cultivo de la Etapa III, pero usualmente es necesario adoptar un procedimiento de enraizamiento separado usando medios especiales, o métodos, para inducir la formación de las raíces. A veces los brotes pueden necesitar ser especialmente alargados antes de que se intente el enraizamiento. Para enraizar los explantes se utilizan principalmente plántulas individuales de un tamaño aproximado de 2 cm. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que sólo contenga hormonas del tipo auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y forman sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

Etapa V: Transferencia al entorno natural

Las plántulas son transferidas desde el ambiente *in vitro* al ambiente externo *ex vitro*. Si no se lleva a cabo con cuidado, la transferencia puede producir una pérdida significativa de material propagado. Hay dos razones principales: Los brotes desarrollados en cultivo se han producido a menudo en alta humedad y una intensidad de luz baja, lo que trae como resultado que haya menos cera o cera epicuticular foliar con una composición química alterada, que en plantas criadas en cámaras de crecimiento o invernaderos. En algunas plantas, los estomas de hojas producidas *in vitro* también pueden ser atípicos e incapaces de cierre completo bajo condiciones de baja humedad relativa. Por lo tanto, las plantas cultivadas *in vitro* pierden agua rápidamente cuando se mueven a condiciones externas. La segunda razón está basada en que debido al suministro de sacarosa (o algún otro carbohidrato) y la incubación en condiciones de poca luz, las plántulas micropropagadas no dependen totalmente de su propia fotosíntesis. Un estímulo que no se proporciona en el ambiente cerrado *in vitro* parece ser necesario para que puedan cambiar a ser plenamente capaces de producir sus propias necesidades de carbono y nitrógeno reducido. El cambio sólo ocurre después de que las plantas hayan pasado un período de varios días *ex vitro*.

Las plántulas se retiran de su etapa IV, y si se han cultivado en medio con agar, el gel se lava cuidadosamente de las raíces. Las plántulas se trasplantan a continuación en un medio de enraizamiento adecuado (tal como un compost de turba: arena) y se mantienen

durante varios días en alta humedad y en intensidad luminosa reducida. Una buena cantidad de vapor de agua es muy eficaz para mantener la humedad. Alternativamente, para mantener la alta humedad se sugiere colocar las plantas dentro de un recinto de plástico claro.

2.4.2) Organogénesis

En el cultivo *in vitro* es de gran importancia el desarrollo de la organogénesis, la cual hace referencia a la capacidad de las células vegetales que se encuentran en el explante para reprogramar su desarrollo hacia la formación de tejidos y órganos nuevos que constituyen una planta (Smith, 2012). La organogénesis requiere que las células susceptibles de esta reprogramación genética, sean competentes y por ende receptivas a procesos de desdiferenciación y diferenciación celular (Thorpe, 2014), que permitirán el desarrollo de meristemas, yemas y brotes adventicios hasta la obtención de una plántula completa. La organogénesis puede darse de forma directa o indirecta (Reinoso, 2014).

a) Organogénesis directa

La producción directa de yemas o brotes de un tejido en el cual no hay estado de callo es denominada organogénesis directa (Cardozo, 2005). Según George y col. (2008), la regeneración directa del brote depende de la naturaleza del órgano de la planta de la cual se derivó el explante, y es altamente dependiente del genotipo de la planta. Se pueden formar brotes adventicios *in vitro* sobre trozos de tejido derivados de diversos órganos (por ejemplo, hojas, tallos, pétalos de flores o raíces). En otras especies, se producen sólo en una gama limitada de tejidos tales como escalas de bulbo, embriones de semillas o tejidos de plántulas. La morfogénesis directa se observa rara vez, o es desconocida, en muchos géneros de plantas.

b) Organogénesis indirecta

La organogénesis indirecta, ocurre a partir de masas de células desorganizadas y en proceso de desdiferenciación y rediferenciación denominadas callo. Los callos se desarrollan cuando los explantes son cultivados en un medio el cual tiene distintos niveles de auxina y citoquininas, los cuales interactúan con los fitorreguladores endógenos para

llegar a un equilibrio para la formación de órganos (organogénesis) (Reinoso, 2014). La inducción de plantas usando esta técnica no asegura la fidelidad clonal, pero puede ser ideal en un sistema para la selección de variantes somaclonales debido a la variabilidad genética que existe en la células somáticas o debido a la inducción de mutaciones o cambios epigenéticos, con el fin de obtener caracteres deseados, además de la multiplicación masiva. La inducción de plantas vía callo ha sido usada para la producción de plantas transgénicas en las cuales el callo es transformado y las plantas son regeneradas (Reinoso, 2014).

2.4.3) Antecedentes de micropropagación y organogénesis en *Dioscorea* sp.

Kohmura y col. (1995), obtuvieron plantas a partir del cultivo de microesquejes de *D. opposita* en un medio compuesto por 1/5 de las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS) sin reguladores de crecimiento y formaron microtubérculos después de 6 meses. Perea y col. (2001), realizaron estudios con *D. rotundata* "espino" a partir de microesquejes, en medio MS, con el empleo de 3 mg/L de Benciladenina (BA), obteniendo el desarrollo de tres yemas por explante.

Chen y col. (2003), desarrollaron un protocolo para la micropropagación de *Dioscorea zingiberensis* a partir del cultivo de segmentos nodales, reportando que el medio suplementado con 4,4 μ M de BA y 1,1 μ M de Ácido Naftalenacético (ANA), permitió el desarrollo de las yemas laterales y el crecimiento de los vástagos hasta alcanzar una longitud promedio de 50 mm a los 20 días de cultivo.

Quintero y col. (2003) evaluaron el efecto de distintas concentraciones de ANA (0; 0,3; 0,6 y 0,9 mg/L) sobre el enraizamiento *in vitro* de tres cultivares de ñame (Diamante 22, 003 y 005), concluyendo que concentraciones de 0,6 y 0,9 mg/L favorecieron el incremento en el número y grosor de las raíces, independientemente del cultivar.

Kadota y Niimi (2004) estudiaron la micropropagación de *D. japonica* variando la consistencia física del medio de cultivo, concluyendo que la proliferación de los vástagos en medio MS líquido fue superior a la obtenida en medio MS sólido en el número de nudos (6,9 y 2,1 respectivamente) y en el peso fresco (283,4 y 51,9 mg respectivamente). Por otra parte también reportan que para el enraizamiento, el medio de cultivo sólido fue superior al

medio de cultivo líquido en frecuencia de enraizamiento, pero el número de raíces en ese medio fue inferior al obtenido en medio líquido.

Borges y Sosa. (2007) regeneraron *D. alata* para el mantenimiento del germoplasma *in vitro*. La regeneración ocurrió a las 5 semanas, evaluaron el porcentaje de regeneración del explante, la longitud del tallo y la formación de brotes nuevos por explante. Los resultados mostraron altas tasas (100 y 98%) de regeneración de explantes y micropropagación de material *in vitro* mantenido en medio D-571 con 1.5% de manitol + 0.1 o 1 mg/L de BA + 2 g. L⁻¹ de carbón activado, respectivamente.

Oropeza y col. (2006), lograron establecer sistemas de regeneración *in vitro* para *D. alata*. vía organogénesis y micropropagación. Evaluaron la variabilidad genética de estas plantas, y establecieron un protocolo adecuado y eficiente para la extracción y Amplificación al Azar del ADN Polimórfico (RAPDs) de *D. alata*.

Chen y col. (2007), evaluaron el efecto de los reguladores de crecimiento y la sacarosa en la micropropagación y microtuberización de *D. nipponica*, reduciendo a la mitad la concentración de las sales MS y suplementando el medio con 0.5 mg/L de ANA y 1 mg/L de BA, reportando un porcentaje de enraizamiento del 95% de las vitroplantas cultivadas. Royero y col. (2007), indujeron la organogénesis directa en ñame en donde utilizaron MS suplementado con 1mg/L BA + 0,5mg/L ANA. Tras 105 días de cultivo se observaron un promedio de 25,15 brotes por explante. El 10% de los microesquejes cultivados presentaban formación de callo y la regeneración de 5,3 brotes por fragmento de callo de 1cm².

Poornima y Ravishankar (2007), establecieron la micropropagación de dos especies silvestres de ñame, *D. oppositifolia* y *D. pentaphylla*, a partir del cultivo de segmentos nodales en medios MS suplementados con 2 mg/Lde BA, reportando 7,50 brotes/explante para *D. oppositifolia* y 5,16 brotes/explante para *D. pentaphylla*. El enraizamiento se logró subcultivando las plantas en medio MS con 0,5 mg/L de ANA obteniendo raíces con una longitud promedio de 7,83 cm para *D. oppositifolia* y 3,50 cm para *D. pentaphylla*.

Ezeibekwe y col. (2009), evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas sobre la regeneración *in vitro* de *D. rotundata*, reportando que la

combinación 0,5 mg/L de ANA con 0,2 mg/L de BA incrementó el número de las hojas (7,80), brotes (9,40) y raíces (15,20), a las 10 semanas de cultivo.

Behera y col. (2009), usaron segmentos nodales de plantas de 45 días de edad de *Dioscorea opositifolia*. Los explantes se cultivaron en medio MS suplementado con diferente concentración y combinación de citoquininas y auxinas para la proliferación primaria de brotes. La mayor proliferación de brotes se observó en medio MS que contenía 2,0 mg/L de Cinetina (K), 1 mg/L BA, 0,5 mg/l ANA y 100 mg/L de ácido ascórbico donde el 90% de los explantes mostraron proliferación con mayor tasa de multiplicación de brotes (10.5 brotes por explante). Para el enraizamiento obtuvieron una tasa de supervivencia del 90% en condiciones de campo.

Borges y col. (2009) establecieron un método eficiente para la conservación *in vitro* de *Dioscorea alata*, basado en la modificación del medio de cultivo (MS al 75% + vitaminas MS + sacarosa 30 g/ L + carbón activado 2 g./L con distintos niveles de manitol y BA. Los tratamientos consistieron en la adición en el medio de cultivo de manitol (0; 0,5 y 1,5%) y BA (0; 0,1 mg/L). Lograron de manera efectiva la conservación de vitroplantas a partir de segmentos uninodales de *D. alata* clon caraqueño con altos porcentajes de supervivencia, un número significativo de microtubérculos, los menores porcentajes de senescencia foliar y 100% de regeneración en plantas completas con un crecimiento normal.

Behera y col. (2010), establecieron la micropropagación de *D. bulbifera* a partir de segmentos nodales, reportando que la multiplicación de los brotes (8,5 brotes/explante) se obtuvo en medios MS suplementados con 2 mg/L de K, 1 mg/L de BA y 0,5 mg/L de ANA, con un enraizamiento profuso (5,8 raíces por planta) cuando las plantas fueron subcultivadas en medios MS con 2 mg/l de ANA.

Borges y col. (2009), optimizaron la micropropagación de *D. alata* clon caraqueño, estudiando el efecto de diferentes antioxidantes, la concentración de las sales MS y la adición de distintas combinaciones de ANA y BA. Los resultados obtenidos mostraron que las sales MS al 75% de su concentración, el carbón activado (0,5 g/L) o la cisteína (10 mg/L), en combinación con los reguladores de crecimiento ANA/BA (0,01/0,01 mg/L),

incrementaron el número de nudos *de novo* (3,5), la longitud de los vástagos (4,1 cm), el número de hojas (3,8), el número de raíces (5,7) y la longitud de las raíces (6 cm).

Yan y col. (2011), establecieron un protocolo para la propagación *in vitro* de *D. fordii* utilizando medios de cultivo sólidos y líquidos, reportando que la longitud, peso fresco y peso seco de los vástagos micropropagados, así como la frecuencia de tuberización y el número promedio de microtubérculos por vitroplanta fueron significativamente mayores en el medio de cultivo líquido en comparación con el medio sólido.

Anike y col. (2012), indujeron la organogénesis en peciolos en tres variedades de ñame en donde utilizaron medios MS suplementados con 2%, 3% y 4% de sacarosa, 100 mg/L de mioinositol, 10 μ M de cinetina y 1,5 mM de putrescina. Obtuvieron el mayor número de brotes en el medio suplementado con 2% de sacarosa.

Thankappan y Abraham (2012), desarrollaron un protocolo para la micropropagación y microtuberización de *D. wallichii*. Entre los niveles de sacarosa probados (1-9%), el medio MS suplementado con 8% de sacarosa resultó ser el mejor para la proliferación de los vástagos con una longitud de 11,8 cm y 9,6 nudos, después de 17 días de cultivo. Con relación a la microtuberización, la mayor cantidad de microtubérculos, de mayor diámetro (5,28 cm) y mayor peso fresco (650 mg) se obtuvo también en medios suplementados con 8% de sacarosa a los 4 meses de cultivo.

Cabrita (2014), logró optimizar la micropropagación de plantas de ñame, clon colombiano reportando que la mayor longitud de los brotes ($6,7 \pm 0,8$ cm) se obtuvo en vitroplantas cultivadas en medios líquidos MS suplementados con 75 g/L de sacarosa y bajo luz blanca continua, a los dos meses de cultivo.

Díaz y col. (2015), establecieron medios de cultivo óptimos para la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de diferentes accesiones de *D. alata* y *D. rotundata* pertenecientes al banco de germoplasma de la Universidad de Sucre, durante un periodo de 8 meses. Esto mediante la modificación del medio de cultivo MS con los siguientes osmolitos: sacarosa, manitol y sorbitol. Se evaluaron 8 tratamientos (T) con las siguientes proporciones: T1 (control) (3:0:0), T2 (0:1,5:0), T3 (0:0:2), T4 (0:1,5:2), T5 (0:0:1) y T6 (0:0:3), T7 (0:1,5:1) y T8 (0:1,5:3). Cada 30 días se evaluaron la: supervivencia (%), hojas

expandidas (%), longitud del tallo y raíz, número de nudos y raíces, oxidación (%), senescencia foliar (%) y callo (%). Los resultados mostraron que las especies de *D. alata* y *D. rotundata* se conservan de forma óptima, en la combinación T4 (0:1,5:2), donde se evidencia un alto porcentaje de supervivencia, un mínimo porcentaje de senescencia foliar y un desarrollo restringido en el resto de variables; garantizando así la disponibilidad y el desarrollo normal de las accesiones en un periodo superior a 4 meses.

Ramos y col. (2015), establecieron *in vitro* plantas de *D. coriacea*, en donde evaluaron tres medios de cultivo, y obtuvieron el mayor número de brotes en el medio MS suplementado con BA 1 mg/L, ácido giberélico (AG₃) 1 mg/L y putrescina 2 mg/L.

Moreno (2016), evaluó el efecto de la consistencia física del medio de cultivo MS, la concentración de las sales que lo componen y del fotoperiodo, para el establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro* de ñame. El medio semisólido con las sales completas MS y la incubación bajo luz blanca continua, favoreció el crecimiento de las vitroplantas de ñame con un promedio de 3,12 brotes por explante y una longitud promedio de los brotes de 8,5 cm. El cultivo en medio líquido y la incubación bajo días cortos, permitió inducir la formación de microtubérculos, los cuales pueden ser utilizados como material vegetal de plantación (semilla), con una alta calidad fitosanitaria, producidos masivamente y en menor tiempo, en comparación a lo esperado cuando los tubérculos son cosechados de manera convencional.

Borges y col. (2017), emplearon segmentos uninodales *in vitro* de *Dioscorea rotundata* Poir. "Blanco de guinea" y determinaron la influencia del Pectimorf en el medio de cultivo *in vitro* y su efecto adicional en la aclimatación de las plántulas de ñame. El pectimorf es un producto de origen natural contutuido de una mezcla de carbohidratos biológicamente activos, con un 58-61% de ácido galaturónico y que se usa en el cultivo *in vitro*, para promover el enraizamiento. Los medios de cultivo MS a 75% con diferentes concentraciones de Pectimorf (3,0; 6,0; 9,0; 12,0; 15,0 mg/L) y un tratamiento control (sin Pectimorf). La adición de Pectimorf® a razón de 6,0 mg/L en el medio de cultivo *in vitro* fue la concentración más adecuada con una influencia significativa en el desarrollo vegetativo de las plantas *in vitro* y un efecto residual favorable en las plántulas aclimatadas de ñame clon "Blanco de guinea".

2.5) Bancos de germoplasma

Los bancos de germoplasma de todo el mundo poseen colecciones muy diversas de recursos fitogenéticos, y su objetivo general es la conservación a largo plazo y la accesibilidad del germoplasma vegetal para los fitomejoradores, investigadores y otros usuarios. Los recursos fitogenéticos constituyen el material de partida para el mejoramiento de cultivos, y su conservación y uso es esencial para la seguridad alimentaria y nutricional mundial. La conservación sostenible de estos recursos fitogenéticos depende de una gestión eficaz y eficiente de los bancos de germoplasma mediante la aplicación de normas y procedimientos que aseguren la continua supervivencia y disponibilidad de los recursos fitogenéticos. (FAO, 2014; Albarrán y col. 2011).

Las técnicas de cultivo *in vitro* pueden ser útiles en las diferentes etapas de la conservación ex situ. Según la FAO, 2014. Los pasos definidos para su conservación son los siguientes:

- Adquisición de germoplasma.
- Vigor y viabilidad.
- Almacenamiento hidratado de semillas recalcitrantes.
- Cultivo *in vitro* y almacenamiento en crecimiento lento.
- Documentación, distribución e intercambio.
- Seguridad y duplicación de seguridad

De esta forma se puede realizar colecta *in vitro* para facilitar el transporte de material vegetal y disminuir su riesgo de deterioro. En la cuarentena, las técnicas *in vitro* pueden erradicar la presencia de virus, bacterias y hongos mediante el uso de termoterapia o quimioterapia, seguido del cultivo de meristemas, y de esta forma el material vegetal preservado *in vitro* es de mejor calidad que el conservado en campo (Ashmore, 1997).

La estación experimental del INIA, en Iquitos, Perú, tiene una pequeña colección de doce ecotipos de ñame de la región. En la isla Guadalupe, el CIRAD tiene 77 accesiones colectadas a nivel mundial, incluyendo algunos híbridos. Uno de los centros en donde más se estudia la diversidad genética de este cultivo es el Instituto Internacional de Agricultura Tropical, IITA, en Ibadan, Nigeria. Desde este centro el Grupo Consultivo de Investigación

Agrícola Internacional (GCIAR), se concentra la investigación global en mejoramiento genético, selección de variedades resistentes a plagas, virus y enfermedades, líneas de alto rendimiento utilizando germoplasma local y extranjero que conserva en su banco de germoplasma (González, 2003).

Dada la importancia de los materiales de ñame que serán objeto de esta investigación, el establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro* permitirá el resguardo de la variabilidad genética de los clones venezolanos de ñame. Para el establecimiento de un banco de germoplasma *in vitro*, no sólo se debe proceder al cultivo de los materiales en condiciones asépticas mediante los métodos descritos en el capítulo anterior, sino que dada la poca información de la procedencia y características de los mismos, estos clones deben ser caracterizados a nivel morfológico y molecular.

González (2003), realizó una caracterización morfológica y molecular de seis genotipos de *Dioscorea* sp. de la colección de germoplasma del CATIE del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP, en donde las características cuantitativas permitieron identificar los niveles de variabilidad entre seis genotipos que son considerados de interés económico para el sector agrícola de producción de raíces y tubérculos en Panamá.

Bonilla y col. (2012), determinaron la secuencia para el establecimiento de programas de saneamiento y propagación masiva de *Dioscorea in vitro* y aspectos relacionados con la obtención de metabolitos secundarios con fines comerciales, investigativos y conservación de germoplasma que permita el mantenimiento e intercambio a nivel local, nacional e internacional.

Finalmente y como mencionamos antes, Moreno (2016), evaluó el efecto de varios parámetros para el establecimiento del banco de germoplasma de ñames venezolanos.

2.6) Descriptores morfológicos

El conocimiento de la diversidad genética de especies ampliamente distribuidas es importante para su conservación y distinción genética y fenotípica, pues generalmente muestran variación morfológica, fisiológica y en la estructura genética de sus poblaciones.

Esta variación puede deberse a diversos factores como el ambiente en el cual éstas se desarrollan por lo que es común encontrar fenotipos diferentes de una misma especie. Se ha sugerido entonces, el desarrollo de análisis morfológicos para mejorar la distinción entre especie o variedad dentro de los géneros o dentro de las especies de un género (Piña y col. 2010).

Los caracteres morfológicos son muy usados en la identificación de especies, familias y géneros de plantas. Además, las características morfológicas han sido tema de numerosos estudios en genética de poblaciones y en la agricultura, donde se han realizado estudios en la resistencia a plagas y enfermedades y los rendimientos que generalmente son afectados significativamente por las interacciones entre el genotipo y el ambiente (González, 2003). Los niveles de variabilidad pueden ser estimados usando caracteres morfológicos. Su respuesta a la selección y sus antecedentes genéticos pueden ser determinados; estos tipos de caracteres son usualmente dominantes y recesivos. Es así que la mayoría de las plantas cultivadas con importancia económica tiene sus patrones de identificación, caracterización y evaluación. Para llegar a estos protocolos se han realizado estudios básicos de las características en el sentido de conocer la variabilidad de los caracteres dentro y entre plantas; luego se han seleccionado aquellas características cualitativas y cuantitativas que han resultado ser más útiles para la descripción (González, 2003).

La caracterización morfológica además de ser muy sencilla y menos costosa en lo que confiere a la metodología que se emplea, tiene la ventaja de dar conocimientos acerca del germoplasma disponible de una especie o variedad, adicionalmente a esto, el establecimiento de la representatividad de la colección, por ejemplo en los bancos de germoplasma y para la identificación de genes (Lopez y col. 2008).

Un descriptor es una característica o un atributo que hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de un individuo dentro de un banco de germoplasma. Deben ser altamente heredables, con alto valor taxonómico y agronómico y su expresión debe ser detectada a simple vista y registrada fácilmente para permitir diferenciar una acción de otra (Moreno, 2016). Estos atributos son fácilmente observables y se expresan de la misma forma en cualquier ambiente; por ejemplo, la altura de la planta, el color de la hoja apical,

días de floración y color de la flor; los rendimientos y la resistencia a enfermedades (Jiménez y Hernandez, 2009). Teóricamente el número de datos que se pueden tomar durante la caracterización y la evaluación es infinito, pero una buena descripción de las plantas no está determinada por el número de variables descritas, sino por la utilidad práctica de las variables y su precisión. En la práctica, la toma de datos se ve limitada a características de importancia en el mejoramiento o para el uso de la planta, que sean de utilidad para conocer la estructura poblacional de la especie (López, 1999).

Los tipos de características para evaluar y caracterizar la diversidad genética son numerosos. Tradicionalmente se han utilizado las variaciones morfológicas relacionadas especialmente con el hábito de crecimiento, tamaño, forma y color de la semilla. Esta variación es mayor en las formas cultivadas que en las formas silvestres (López 1999). Los descriptores morfológicos se pueden agrupar en dos tipos. Uno de ellos es el **botánico-taxonómico** referidos a características altamente heredables y de poca variabilidad, como la forma de los tubérculos, del tallo, de las hojas, flores y de la semilla. El tipo **morfoagronómico** comprende los caracteres morfológicos que son relevantes en la utilización de las especies cultivadas. Pueden ser de tipo cualitativo o cuantitativo. Cualitativos como: color del follaje, del tallo, el tubérculo, las flores, el fruto. Cuantitativos: cuando las características son físicamente medibles como el peso y tamaño del tubérculo, número de flores por planta y número de semillas por capítulo (Polanco, 2011).

Los descriptores se presentan en un formato internacional y por ello proporcionan un lenguaje comprensible universalmente para los datos sobre los recursos filogenéticos. Las lista de los descriptores permiten disponer de un medio rápido, fidedigno y eficaz para almacenar y comunicar la información presente en una colección (Moreno, 2016). El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) ubicado en Roma, Italia ha publicado listas de descriptores para 78 géneros de plantas. Cada una de estas listas promueven la recolección de datos sobre las categorías: Pasaporte, Manejo, Sitio, Ambiente, y Evaluación (IPGRI/IITA 1997).

Descriptores de pasaporte: Dan información básica que se utiliza para el manejo general de la accesión (incluido el registro en el germoplasma y cualquier otra información

de identificación) y describen los parámetros que se deberían observar cuando se hace la recolección original de la accesión.

Descriptor de manejo: Proporcionan la información de las bases para el manejo de las accesiones en el banco de germoplasma y ayudan durante su multiplicación/regeneración.

Descriptor de sitio y el ambiente: Describen los parámetros específicos del ambiente que son importantes cuando se realizan pruebas de caracterización y evaluación. Se incluyen también en esta categoría los descriptores del sitio de recolección del germoplasma.

Descriptor de caracterización: permiten una discriminación fácil y rápida entre fenotipos. Generalmente son caracteres altamente heredables, pueden ser fácilmente detectables a simple vista y se expresan igualmente en todos los ambientes. Además pueden incluir un número limitado de caracteres adicionales considerados deseables por consenso de los usuarios en un cultivo en particular.

Descriptor de evaluación: muchos de los descriptores de esta categoría son susceptibles a las diferencias ambientales pero son generalmente útiles en el mejoramiento de un cultivo. Pueden involucrar la caracterización bioquímica y molecular, rendimiento, productividad agronómica, susceptibilidad al estrés y caracteres citológicos.

Los descriptores morfológicos de las plantas que pertenecen al género *Dioscorea* sp. comprenden características como diámetro del tallo joven y maduro, presencia o no de espinas en la base del tallo o en todo el tallo, forma de las hojas jóvenes y maduras, tipo y posición de la inflorescencia, tamaño del fruto, presencia o ausencia de tubérculos aéreos, forma del tubérculo subterráneo, etc. (IPGRI/IITA, 1997). Moreno (2016) aplicó estos descriptores a 6 clones de ñame establecidos *in vitro*; destacando los descriptores con mayor poder de discriminación entre variedades de ñame que son los que serán utilizados en el presente trabajo.

2.7) Caracterización molecular

La caracterización e identificación tradicional de variedades de plantas se ha basado en el empleo de caracteres morfológicos y/o agronómicos. No obstante, el uso de marcadores morfológicos tiene muchas limitantes, pues su expresión puede estar sujeta a factores ambientales. Gracias a los avances en la biología molecular se han desarrollado métodos de identificación y caracterización basados en el uso de marcadores moleculares que superan, en la gran mayoría de los casos, las limitaciones de los métodos tradicionales (Azofeifa, 2006). Numerosas variables y caracteres, se han utilizado para observar y detectar la variabilidad presente en las plantas. Los marcadores moleculares son una clase de éstos y, con ellos, se espera que reflejen la variabilidad existente entre los individuos o poblaciones en estudio (Aguilar, 2012), por ello se utilizan cada vez más para examinar la diversidad genética de las especies de ñame cultivadas y silvestres.

Los marcadores moleculares pueden ser definidos, como un segmento de ADN representativo de las diferencias a nivel genómico; en especial las técnicas basadas en la amplificación por PCR, ampliamente utilizadas en diversos cultivos, permiten la obtención de “huellas digitales” para el germoplasma vegetal (Alva, 2014).

Los marcadores idóneos se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Azofeifa, 2006). Algunos ejemplos de ellos son: Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), Microsatélites o Secuencias repetitivas (Azofeifa, 2006). Dado que en esta investigación se utilizarán los marcadores moleculares tipo RAPD, a continuación se ampliará la información sobre esta técnica.

ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)

Los RAPDs consisten en una técnica basada en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Azofeifa 2006), es la más simple de todas las técnicas moleculares que permite la rápida detección de polimorfismos en un número de loci con sólo pequeñas cantidades (nanogramos) de ADN genómico. La técnica de RAPD, descrita por primera vez

por Welsh y McClelland (1990) y Williams y col. (1990) se ha utilizado rutinariamente para el análisis genético en una amplia gama de cultivos, incluyendo el ñame (Dar y col., 2017). La modificación de la técnica PCR que dio origen al RAPD se logró al sustituir el uso de un par de oligonucleótidos (“primers”, iniciadores o cebadores) largos, por un solo “primer” corto de secuencia al azar y con la capacidad de unirse a muchos loci diferentes. El producto de esa unión pueden ser bandas polimórficas cuando se ha producido una pérdida, inserción o cambio de un solo nucleótido en la cadena molde (Gonzalez, 2003).

Los RAPDs, son marcadores dominantes, o sea, que la aparición de una banda implica que existe una homología con los primers, todos los demás alelos que no son homólogos al sitio de unión con el primer no se amplifican, y no se pueden distinguir individuos homocigos de los heterocigos. La naturaleza de los fragmentos amplificados está fuertemente influenciada por las secuencias del ADN del organismo en estudio y las del oligonucleótido y de las condiciones de la reacción (Becerra y Paredes, 2006). Los resultados de RAPDs obtenidos en plantas indican su herencia dominante, su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5-10 loci por “primer”), su tremenda potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas (Azofeifa, 2006).

La eficiencia de los marcadores RAPDs puede estar influenciada por varios factores (Azofeifa, 2006):

- 1) **ADN molde:** es el ADN de cadena doble proveniente del organismo que se quiere analizar. La concentración óptima de ADN es de 10-50 ng por 50 μ l de reacción.
- 2) **“Primer” o cebador:** oligonucleótido o segmento corto formado por una cadena simple de nucleótidos, usualmente 10 en el caso de RAPDs y deben tener un contenido de al menos un 50% de guanina-citocina para funcionar correctamente, con la propiedad de localizarse y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado.
- 3) **Desoxiribonucleótidos:** se requieren concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y dTTP para la síntesis de la cadena.
- 4) **Solución “tampón”:** las soluciones deben contener concentraciones óptimas de iones potasio y magnesio y ser calibrada a un pH de 8,4.

5) **Taq-polimerasa:** es la enzima ADN-polimerasa termoestable extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN mediante su síntesis a partir de un punto determinado fijado en este caso por el “primer”.

Según González (2003), durante todo el análisis RAPD se da una serie de reacciones químicas en forma cíclica, las cuales involucran tres fases que son definidas por cambios en la temperatura:

1) Desnaturalización del ADN que ocurre entre 93-95° C: las dos cadenas se separan y permanecen en suspensión hasta que la temperatura se reduce.

2) Unión con el “primer” a 35°C, en sitios complementarios de la cadena de ADN disociada.

3) Síntesis del segmento complementario de la cadena en una dirección específica (5' a 3') a partir de la unión del “primer”. Se produce mediante la acción de la polimerasa y la presencia de desoxiribonucleótidos libres en la solución y otros elementos minerales como el magnesio y el potasio, esta fase se produce a 72° C.

Estas tres fases constituyen el ciclo completo de amplificación el cual se repite entre 40 y 50 veces bajo condiciones que asemejan a las que ocurren en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), logrando la amplificación exponencial de varios fragmentos de ADN. Estos fragmentos sintetizados son los marcadores RAPD y se visualizan mediante la electroforesis en un gel de agarosa coloreado con bromuro de etidio, con la ayuda de luz ultravioleta (Gonzalez, 2003).

Ventajas y desventajas de la técnica RAPD

Según Atienzar (2006), el ensayo RAPD y las técnicas relacionadas presentan numerosas ventajas sobre los métodos basados en hibridación. En particular, no se requiere conocimiento previo del genoma investigado. Estos ensayos requieren muy poco material de partida y bajo ciertas circunstancias, el análisis también puede llevarse a cabo de forma no destructiva que puede ser útil para la evaluación de muestras extrañas o valiosas. Además, se utiliza un cebador de oligonucleótido aleatorio único, lo que significa que empleando diferentes cebadores, se pueden generar rápidamente perfiles de bandas que

difieren en complejidad. Otra ventaja notable es el alto nivel de la sensibilidad general de la técnica. Además, estas tecnologías son relativamente baratas y no requieren el uso de equipos especializados y costosos. Otra ventaja es que después de la optimización, el ensayo RAPD es muy fiable y tiene el potencial de detectar una amplia gama de daños en el ADN (por ejemplo, ruptura del ADN), así como mutaciones (mutaciones puntuales y grandes reordenamientos). En el campo de la biotecnológica vegetal, el análisis RAPD y las técnicas relacionadas permiten obtener “huellas digitales” (fingerprints).

A pesar de haber demostrado gran utilidad para muchas aplicaciones, en el análisis RAPD pueden surgir problemas que disminuyen su capacidad discriminativa. Los problemas incluyen la presencia de productos de amplificación contaminados en las reacciones de los controles negativos que no contienen ADN. Algunos estudios también han criticado la técnica sobre la base de que carece de reproducibilidad y herencia Mendeliana debido a las condiciones de baja estrictez empleada (es decir, baja temperatura de anillamiento), que podría conducir a una amplificación contaminada. La mayoría de los estudios que experimentaron algunos problemas de reproducibilidad sugiere que los resultados se debieron a artefactos, contaminación o mutación en el ADN genómico. Cuando los perfiles RAPD no son reproducibles, los investigadores generalmente afirman que la variación se debe a los artefactos, aunque no suele presentarse evidencia de tal evento. Sin embargo, tomando las recomendaciones señaladas anteriormente se tienen resultados confiables y reproducibles según lo reportado por Oropeza y col. (2006), Zannou y col. (2009) y Ukpaki. (2014), donde establecieron protocolos eficientes para la extracción y amplificación de ADN de diferentes especies de *Dioscorea*.

2.8) Antecedentes relacionados con la caracterización morfológica y molecular de *Dioscorea* sp.

Asemota y col. (1996), usaron RAPD para caracterizar once cultivares de las cinco especies de ñame económicamente más importantes cultivadas en Jamaica (*Dioscorea alata*, *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. trifida* y *D. esculenta*). Amplificaron las muestras de ADN genómico con nueve iniciadores arbitrarios diferentes, el análisis reveló un total de 338 posiciones de banda diferentes, que varían en tamaño de 0.3 a 2.5 kb. Los patrones de RAPD demostraron ser altamente reproducibles. No observaron ninguna variación entre las

plantas que pertenecen al mismo cultivar, un gran número de polimorfismos intervarietales e interespecíficos les permitió discriminar de manera confiable entre todos los cultivares de Jamaica investigados.

Cheng y Liu. (1996), detectaron variaciones genéticas mediante la técnica RAPD en doce líneas de *Dioscorea alata* L. Emplearon veinte iniciadores de 10 bp para realizar el análisis. De los 12 iniciadores escogidos, 180 marcadores polimórficos RAPD se anotaron para todas las líneas estudiadas. Los resultados mostraron que hubo variaciones considerables entre las líneas de *D. alata*, incluso entre las líneas de la misma región.

Ramser y col. (1996), evaluaron la variabilidad intraespecífica y las relaciones en el ñame aéreo (*Dioscorea bulbifera* L.) a través de marcadores RAPD. Un total de 23 accesiones de diferentes ubicaciones geográficas en África, Asia y Polinesia se analizaron mediante 10 iniciadores arbitrarios. Obtuvieron huellas dactilares polimórficas altamente reproducibles que fueron generadas por los 10 cebadores, dando como resultado un total de 375 caracteres informativos. Solo ocho bandas fueron monomórficas entre todas las accesiones investigadas.

Dansi y col. (2000), examinaron ADN de veintitrés variedades de ñame (*D. cayenensis* / complejo de *D. rotundata*) mediante RAPD, que no habían podido ser separados usando marcadores isoenzimáticos. Los 12 iniciadores probados fueron informativos y produjeron 63 bandas de ADN amplificadas de las cuales 47 (75%) fueron polimórficas. Aunque ningún iniciador produjo bandas polimórficas en todos los cultivares, la gran mayoría de los cultivares se separaron con las combinaciones de bandas polimórficas generadas por varios iniciadores. Se identificaron duplicados putativos y clasificaciones erróneas de cultivares.

Ahuja y col. (2002), evaluaron RAPD de 60 plántulas de *D. floribunda* criopreservadas y 20 cultivadas *in vitro* (control). Demostraron que 10 cebadores produjeron 64 bandas reproducibles claras, siendo los productos de amplificación monomórficos para todas las plántulas ensayadas excepto una. Obtuvieron un total de 5120 bandas. También realizaron un análisis morfológico de las plantas, después del rebrote y observaron que no había diferencias significativas entre las plantas criopreservadas y las

plantas control. Se examinaron los caracteres morfológicos importantes (basados en la lista de descriptores), incluyendo la relación longitud / respiración de la hoja, el número de tallos primarios, la longitud del pecíolo, la longitud internodal y la relación lámina / pecíolo.

González (2003), realizó una caracterización morfológica y molecular de seis genotipos de *Dioscorea* sp. del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP, en donde las características cuantitativas permitieron identificar los niveles de variabilidad entre seis genotipos que son considerados de interés económico para el sector agrícola de producción de raíces y tubérculos en Panamá. La caracterización molecular la llevaron a cabo con 37 genotipos, quince del IDIAP y veintidós del CATIE. Se usaron marcadores moleculares RAPD los cuales mostraron ser una herramienta práctica y útil para estimar las distancias genéticas presentes en 37 genotipos de *D. alata* y *D. trifida*. El análisis molecular les permitió determinar que los genotipos de la colección de germoplasma del IDIAP se separan claramente de los genotipos de la colección de germoplasma del CATIE.

Oropeza y col. (2006), lograron establecer sistemas de regeneración *in vitro* para *D. alata*. vía organogénesis y micropropagación. Evaluaron la variabilidad genética de las plantas regeneradas mediante el establecimiento de un protocolo RAPD adecuado y eficiente.

Sánchez y col. (2008), realizaron una caracterización morfológica de 25 accesiones de ñame colectadas en el suroccidente de Guatemala en donde reportaron la separación en varios grupos debido principalmente a sus diferencias con relación al peso y longitud de los tubérculos.

Zannou y col. (2009), estudiaron la diversidad genética de aproximadamente 70 cultivares de *Dioscorea cayenensis* y *Dioscorea rotundata* (ñame de Guinea) y aproximadamente 20 cultivares de *Dioscorea alata* (ñame de agua), utilizando RAPD. Las bandas amplificadas revelaron un alto polimorfismo. Estos fragmentos de ADN polimórficos se usaron para construir dendrogramas, agrupando todas las accesiones en 18 grupos: 12 para *D. cayenensis* / *D. rotundata* y seis para *D. alata*. El análisis de la varianza molecular reveló una variación altamente significativa entre las especies, entre los grupos dentro de las especies y entre los cultivares dentro de los grupos.

Tariqul y col. (2011), reportaron la caracterización morfológica de 59 accesiones de *D. alata* utilizando descriptores tales como la dirección de trepado de la planta, la presencia de alas o espinas en el tallo, la forma y longitud de la hoja, la forma y tamaño de los tubérculos aéreos y el rendimiento de los tubérculos subterráneos. La máxima variabilidad se encontró en el rendimiento de los tubérculos por planta (98,74%) y la mínima se encontró en la longitud de la hoja (12,55%).

Aguilar (2012), realizó la caracterización morfológica y molecular de 63 accesiones de ñame (*Dioscorea* sp.) del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). En la caracterización morfológica se trabajó con 60 descriptores definidos por el IPGRI/IITA (1997). Con estos descriptores se definieron seis grupos de accesiones siendo las características más discriminantes: longitud del tallo joven, número de entrenudos del tallo joven, número de tallos maduros por planta, número de entrenudos hasta la primera ramificación, número de ramificaciones en el tallo maduro, diámetro del tallo maduro, longitud de los entrenudos en el tallo maduro, número de hojas jóvenes y número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas.

Marín y col. (2012) evaluaron la variabilidad genética y anatomía foliar de plantas de ñame (*Dioscorea alata*) regeneradas *in vitro* por organogénesis y micropropagación. Los resultados arrojaron un 0,12 % de polimorfismo para ambos sistemas de regeneración, lo que implica que ambos sistemas son eficientes para multiplicar masivamente esta especie. La anatomía foliar de las plantas cultivadas *in vitro* es significativamente diferente a la de la planta madre para las características estudiadas.

Ukpaki (2014), realizaron un análisis molecular en *Dioscorea dumetorum* (ñame trifoliado) usando marcadores RAPD. También estos marcadores permitieron comparar las variedades silvestres y cultivadas. De los 100 oligonucleotidos probados, solo 12 de ellos tenían la capacidad de iniciar adecuadamente las reacciones en cadena de la polimerasa del ADN genómico de *D. dumetorum*. El dendograma mostró que las variedades cultivadas silvestres y comestibles están estrechamente relacionadas. Las cuatro accesiones que se diferenciaron morfológicamente principalmente por el grado de espinosidad del tallo, formaron tres grupos con un nivel de coeficiente de similitud de Jaccard del 85%.

Velasco y col. (2014), estimaron los parámetros de diversidad genética junto con el análisis de conglomerados basado en el coeficiente de Jaccard con el objetivo de evaluar la eficacia del RAPD, las Repeticiones de Secuencias Repetitivas (ISSR), el Polimorfismo de Longitud de Fragmento Amplificado (AFLP) y las Repeticiones Etiquetadas de Secuencias Inversas (ISTR) en *Dioscorea* sp. Los contenidos de información polimórfica fueron bastante similares para todos los marcadores (≈ 0.48). La variación genética de *Dioscorea* sp., en términos de heterocigosidad fue menor con ISTR (0,36) y mayor cuando se usaron otros marcadores (RAPD = 0,43; ISSR = 0,45 y AFLP = 0,47).

Wen y col. (2014), realizaron una extracción de ADN y optimizaron el protocolo RAPD mediante el diseño del diagrama ortogonal L16 (44). Los resultados mostraron que el método mejorado de CTAB puede usarse para aislar ADN de alta calidad y alta concentración, y el protocolo optimizado puede superar la inestabilidad del sistema de reacción de RAPD. El conocimiento establecido por estos autores se puede utilizar para estudiar la diversidad genética de *D. opposita* Thunb.

Moreno (2016), realizó una caracterización morfológica de 6 clones de *Dioscorea* sp., utilizando la lista de descriptores publicada por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGR) y el Instituto Internacional de Agricultura Tropical, en donde evaluó 90 descriptores distribuidos de la siguiente manera: 26 relacionados con las características de los tallos (jóvenes y maduros), 30 referidos a las hojas (jóvenes y maduras) y 30 relacionados con los tubérculos subterráneos. Obtuvo que sólo 43 de ellos aportaron información relevante para evaluar la diversidad morfológica entre los clones. El análisis estadístico de agrupamiento les permitió obtener dendrogramas que separan los seis materiales de ñame en tres grupos, siendo el clon D7 y el clon venezolano los que comparten mayor número de características morfológicas, mientras que a nivel molecular, los genotipos del clon D7 y del clon D8 son muy similares.

Purnomo y col. (2016), analizaron treinta y dos cultivares de ñames indonesios para determinar la variabilidad genética mediante RAPD. Los resultados mostraron que los cultivares de ñame de agua eran distintos, en comparación con las otras especies de *Dioscorea*. Los cultivares de ñame de agua de Sumatra, Java, Kalimantan y Célebes

formaron un grupo diferente en comparación con las Molucas, Papúa Occidental y Nusa Tenggara que tienen una gran similitud genética.

Agbidinoukoun y col. (2017), analizaron seis accesiones de ñame (Ala, Bagri Kogan, Kokoro, Sossou y Tankpanou), pertenecientes al complejo *Dioscorea cayenensis-rotundata* establecidas *in vitro* por medio de marcadores moleculares RAPD, usando cuatro cebadores seleccionados para detectar la variación somaclonal. No se observó variación fenotípica durante los quintos subcultivos. Del análisis RAPD tanto de plantas madres como de plántulas *in vitro*, no se observó variación significativa de perfiles de ADN con el mayor coeficiente de similitud (85% a 100%) para todas las accesiones, asegurando así la estabilidad genética de las plantas y la regeneración de plantas idénticas a la planta madre, para al menos cinco subcultivos.

3) OBJETIVOS

3.1) GENERAL:

Establecer un banco de germoplasma *in vitro* con clones venezolanos de ñame (*Dioscorea* sp.)

3.2) ESPECÍFICOS:

- Establecer un proceso de regeneración *in vitro* eficiente para 6 clones venezolanos de ñame
- Caracterizar a nivel morfológico los clones de ñame seleccionados
- Estudiar la variabilidad genética de los clones seleccionados mediante RAPD.

4) MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.) Establecimiento *in vitro* de las plantas que se utilizarán como fuente de explante (plantel) para la micropropagación y organogénesis de los clones de ñame

Para el establecimiento *in vitro* de las plantas de ñame se extrajeron 20 segmentos nodales de 1cm de largo con una o dos yemas de los clones: clon D₂, clon D₇, clon D₈, D₁₁, clon venezolano y clon colombiano, cultivados en el vivero del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal (LMV). A estos segmentos nodales se les realizó una desinfección según la metodología establecida por Royero y col. (2007), con algunas modificaciones en los tiempos de duración en cada paso (Tabla 3), todos los lavados se realizaron dentro de la campana de flujo laminar, incluyendo un lavado con agua destilada estéril entre cada paso.

Tabla 3. Protocolo de desinfección de los segmentos nodales para el establecimiento del plantel.

	Pasos				
	1	2	3	4	5
Lavados	Mezcla de agua destilada con jabón azul comercial	Alcohol al 70%	Cloro comercial al 20%	Fungicida curabarb al 6%	Agua destilada estéril (3 lavados)
Tiempo de inmersión de explantes	30 min	1min	20min	1 día	1 min cada lavado

Seguido a la desinfección, se procedió al cultivo de estos segmentos nodales en frascos de vidrio en medio MS semisólido, suplementado con 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/ml de mioinositol, 100mg/L de cisteína, 30 g/L de sacarosa. El material vegetal fue incubado bajo luz continua, a 25± 1°C, se realizaron observaciones frecuentes durante 2 meses con el propósito de aislar rápidamente algún explante contaminado y evitar la proliferación del patógeno hacia el resto de los explantes sanos.

4.2) Micropropagación de los clones de ñame (*Dioscorea* sp.)

Para la micropropagación de los clones de ñame se extrajeron microesquejes de las vitroplantas de ñame, de dos meses de edad, para ello se utilizaron bandejas de aluminio,

pinzas y bisturíes previamente estériles. El cultivo de los explantes se realizó de la siguiente manera:

- En medio MS semisólido, 20 microesquejes se colocaron en 4 frascos de vidrio (5 microesquejes por frasco).

- En medio con un 1/5 de las sales MS, 20 microesquejes se colocaron en 4 frascos de vidrio (5 microesquejes por frasco).

- En medio MS+ BA (0,5 g/L), 20 microesquejes se colocaron en 4 frascos de vidrio (5 microesquejes por frasco).

Los medios se suplementaron con 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/ml de mioinositol, 100mg/L de cisteína, 30 g/L de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5,8 y se esterilizó en la autoclave a 120 °C y 15 libras de presión por 20 min. Se utilizaron 7 g/L de agar para la solidificación del medio de cultivo. Los frascos se sellaron con papel de aluminio y envoplast.

Los microesquejes fueron incubados en un cuarto de incubación con una temperatura de 25 ± 1 °C, bajo luz blanca continua ($50\mu\text{mol/m.s}$), durante 3 meses.

Una vez culminado el experimento se midieron los siguientes parámetros:

- Número de brotes (NB)
- Longitud de los brotes (LB)
- Número de raíces (NR).

4.3) Organogénesis de los clones de ñame (*Dioscorea sp.*):

Se utilizaron plantas cultivadas *in vitro* obtenidas a partir de microesquejes, de las cuales se tomaron segmentos de tallos con uno a dos yemas (de 1cm de largo) y se cultivaron 5 explantes por frasco en condiciones asépticas.

Los explantes fueron cultivados en medios semisólidos, de la siguiente manera:

1. 20 segmentos de tallo en medios MOC (medio control MS).

2. 20 segmentos de tallo en medio MO5 (MS suplementado con 0,5 mg/L ANA y 1 mg/L BA).

Cada uno de los medios se suplementó con 0,4 mg/L de tiamina, 100 mg/ml de mioinositol, 100mg/L de cisteína, 30 g/L de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5,8 y se esterilizó en la autoclave a 120 °C y 15 libras de presión por 20 min. Se utilizaron 7 g/l de agar para la solidificación del medio de cultivo. Los frascos se sellaron con papel de aluminio y envoplast.

Una vez culminado el experimento se midieron los siguientes parámetros:

- Número de brotes (NB).
- Longitud de los brotes (LB).
- Número de raíces.
- Longitud de los callos (LC).

4.4) Caracterización morfológica de seis clones de ñame

En esta investigación se realizó la caracterización morfológica de seis clones de ñame (clon D₂, clon D₇, clon D₈, D₁₁, clon venezolano y clon colombiano), en donde se utilizó para ello la lista de “Descriptoros para el Ñame (*Dioscorea* spp.)” publicada por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI/IITA, 1997). Estas listas comprenden 154 descriptoros referidos al crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas de ñame; sin embargo, debido a que el proceso de floración es poco frecuente no se tomaron en cuenta los descriptoros relacionados con flores y frutos. Basándonos en el trabajo de Moreno (2016) se utilizaron los descriptoros morfológicos más discriminativos reportados por la autora para clones de ñame venezolanos:

- **Relacionados con las características de los tallos maduros:** Ausencia/Presencia color de las alas, posición de las hojas, forma de la hoja madura, ausencia o presencia de cera.
- **Relacionados a las hojas maduras:** forma de la hoja madura, color de la nervadura, color del peciolo, color del ala del peciolo.
- **Relacionadas con los tubérculos subterráneos:** color de la pulpa.

4.5) Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico, que consiste en un análisis de varianza de una vía (ANOVA), con el fin de determinar el grado de significancia entre los tratamientos que se aplicaron. Estas pruebas están incluidas en el paquete estadístico *ESTADISTICA Versión 5.0*.

Micropropagación:

En la etapa de inducción de brotes: se tomaron muestras al azar con un tamaño de 20 por cada tratamiento y una probabilidad (P) de: $n= 20$ $P< 0.005$.

Organogénesis

Al igual que en la micropropagación, para la organogénesis se tomaron al azar una muestra de 20 por cada tratamiento con una probabilidad (P) de: $n= 20$ $P<0.005$

4.6) Caracterización molecular de 6 clones de ñame cultivado *in vitro*

4.6.1) Extracción del ADN total

El aislamiento del ADN total de las vitroplántulas de ñame se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Oropeza y col. (2006), el cual se basa en el método de Doyle y Doyle (1990), con las siguientes modificaciones:

- a) Un tratamiento con RNAsa “A” (10mg/ml).
- b) Un tratamiento con solución limpiadora: (etanol 76% en 10 mM acetato de amonio (NH_4COOH)).
- c) Precipitación con 7,5 NH_4COOH .

Se determinó la cantidad y pureza del ADN extraído, se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro Thermo Electron modelo Spectronic Genesys 10Bio. Luego se calculó la concentración del ADN (1 unidad de absorbancia a 260 nm=50 mg/ml de ADN), todas las muestras se llevaron a una concentración de 50 ng/ μl . La integridad del

ADN aislado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% en búfer TBE 0,5 X (Sambrook y col., 2001).

4.6.2) Análisis RAPD

El ADN total de cada variedad se evaluó con 10 iniciadores de la serie OPERON, OPA y OPB de 10 pb cada uno (Tabla 3). La preparación de la mezcla para la PCR y las condiciones de amplificación se detallan a continuación:

Tabla 4. Secuencia nucleotídica de los iniciadores OPERON utilizados en las amplificaciones del ADN

Iniciadores	Secuencia Nucleotídica
OPA 01	CAGGCCCTTC
OPA 02	TGCCGAGCTG
OPA 03	AGTCAGCCAC
OPA 04	AATCGGGCTG
OPA 07	GAAACGGGTG
OPA 09	GGGTAACGCC
OPA 13	CAGCACCCAC
OPA 14	TCTGTGCTGG
OPB 05	TGCGCCCTTC
OPB 07	GGTGACGCAG

Reacción de amplificación

La mezcla de reacción se preparó según el protocolo de Demeke y col. (1996). La amplificación por PCR se llevó a cabo en un volumen final de reacción de 25 μ l conteniendo el búfer de reacción 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,1 mM (Biochron), iniciador 0,2 μ M (Bionner), ADN 50 ng, Taq Polimerasa 1 U (Promega). Para cada iniciador se preparó un control negativo (sin ADN).

Condiciones de incubación de la reacción de amplificación

La mezcla de reacción se incubó en un termociclador programable modelo PJC-100 (Perkin-Elmer) usando el ciclado establecido por Williams y col. (1993), que consta de un ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 3

minutos a 94 °C, 2 minutos a 36 °C, 1 minuto a 72 °C, y una extensión final de 7 minutos a 72 °C.

Resolución de los fragmentos amplificados

Los fragmentos amplificados fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en búfer TBE 0,5X. La corrida electroforética se realizó a 80 voltios hasta que el azul de bromofenol migró aproximadamente 3 cm. La tinción de los geles se realizó con Bromuro de etidio y los patrones electroforéticos obtenidos fueron digitalizados en un GelDoc 2000 (BIORAD). Para el análisis de los datos, se utilizó como patrón de peso molecular el marcador λ Hind III de Promega.

Análisis de los polimorfismos obtenidos

Se registraron los tamaños de las bandas polimórficas y monomórficas obtenidas con cada iniciador para cada clon de ñame analizado.

4.7) Análisis general de los resultados obtenidos

Para cada clon introducido en el banco de germoplasma establecido *in vitro*, caracterizado a nivel morfológico y molecular se generó una “Cartilla de Presentación” del clon donde se destacan sus características morfológicas más resaltantes, su huella de ADN RAPD y una fotografía de la vitroplanta establecida.

5) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1) Establecimiento *in vitro* de la micropropagación de los seis clones de ñame

Se establecieron plantas *in vitro* de cada una de los clones de ñame mostrados en la Tabla 5; donde se logró obtener más del 70% de los segmentos nodales de cada clon libres de agentes contaminantes (hongos y bacterias), excepto para el clon D7 el cuál presentó problemas en el proceso de establecimiento *in vitro* con un 40 % de explantes sanos en comparación con los resultados obtenidos para lo demás clones establecidos, debido a que presentó mayor porcentaje de explantes contaminados por hongos y bacterias. Este resultado indica que el protocolo de desinfección no fue tan eficiente para el clon D7 (Figura 1.). Estos resultados no concuerdan con lo obtenido por Moreno (2016), donde el establecimiento del clon D7 mostró tener mejores resultados (81% de los explantes sanos y 11% contaminados).

Tabla 5. Índices de contaminación de explantes de seis clones de ñame

Clon	N° de explantes cultivados	Explantes sanos (%)	Explantes oxidados (%)	Explantes muertos por contaminación (%)
D2	20	81	12	7
D7	20	40	0	60
D8	20	79	11	10
D11	20	75	25	0
CV	20	90	5	5
CC	20	92	8	0

Se ha reportado que el uso de sustancias desinfectantes evitó el contagio de agentes patógenos a los explantes cuando se toman directamente del campo. Generalmente se utilizan productos económicos como el hipoclorito de sodio, el hidróxido de sodio y alcohol exponiendo el tejido a una concentración bajo un tiempo prolongado. (Borges y col. 2009a, Mwrigi y col. 2010, Royero y col. 2007).

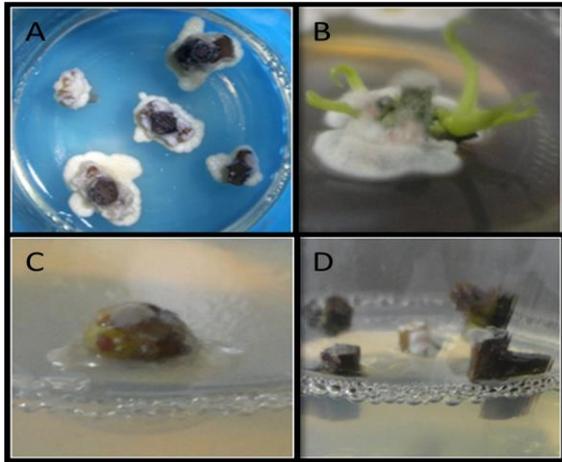


Figura 1. Segmentos nodales del clon D7 D8 y D11 (A, B Y D) en donde se evidencia la contaminación por hongos, D2 (C) contaminación por bacterias.

Borges y col. (2009), también reportaron el uso de hipoclorito de sodio como desinfectante a diferentes concentraciones y tiempos de sumergimiento de explantes uninodales de *D. alata* L. (clon Carequeño). El tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio al 1,5% durante un tiempo de inmersión de 30 min fue el de mayor efectividad para el establecimiento *in vitro* de explantes de *D. alata* L. clon caraqueño con altos porcentajes de supervivencia. Quintero y col. (2003), también reportan que el uso de hipoclorito de sodio durante 10 min una sola vez, seguido de lavado con agua destilada estéril, facilita la desinfección de segmentos nodales en *Dioscorea* spp. Sin embargo, Malaurie y col. (1993) estableciendo la conservación *in vitro* del germoplasma de *Dioscorea* spp. a partir de segmentos del tallo (uninodal) y semilla asexual utilizaron como sustancia desinfectante el cloruro de mercurio (HgCl₂) al 1%. Actualmente el uso de este tipo de sustancias es restringido por sus efectos tóxicos y difícil eliminación del ambiente donde se vierte.

Al igual que Moreno (2016), en la presente investigación se utilizó cloro comercial al 20% para el proceso de desinfección de los segmentos nodales de seis clones de ñame, lográndose un resultado exitoso en el establecimiento *in vitro* de los seis materiales.

Por otra parte, se evidenció el oscurecimiento de los tejidos de los explantes producto de la oxidación de sustancias fenólicas presentes en estos clones de ñame. El 25% de los explantes del clon D11 presentaban mayor oxidación de los tejidos, por el contrario

los clones D2, D8, clon venezolano y clon colombiano presentaron un porcentaje de oxidación menor al 12%, el clon D7 fue el único clon que no mostró oxidación (Tabla 5).

La oxidación de compuestos fenólicos encontradas en tejidos cultivados *in vitro* de ñame es catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) para producir quinonas las cuales son especies químicas muy reactivas y propensas a reaccionar, generando daño hasta incluso muerte celular (Azofeifa, 2009). En el presente trabajo los porcentajes de oxidación obtenidos fueron bajos debido a que en el medio de cultivo se adicionó cisteína que es un antioxidante que permite neutralizar o eliminar los fenoles presentes en estos explantes. De igual forma, distintos autores han utilizado compuestos antioxidantes satisfactoriamente en el medio de micropropagación de ñame como, cisteína 20 mg/L (De la Cruz y col. 1998; Salazar y Hoyos, 2007), 100 mg/L (Royero y col, 2007, Moreno, 2016) y carbón activado a concentraciones de 0,5 g/L (Borges y col., 2007), 1 g/L⁻¹ (Medero y col., 1999).

Borges y col. (1999) durante el estudio de la adición de diferentes antioxidantes (cisteína 20 mg/L, ácido cítrico, ácido ascórbico y polivinilpirrolidona 100 mg/L) en el medio de micropropagación de ñame (*D. alata*), demostraron que no hubo diferencias significativas para los distintos antioxidantes usados.

Se ha reportado que diferentes antioxidantes evaluados ejercieron un efecto fisiológico importante en el cultivo *in vitro* de ñame, ya que disminuyeron de manera efectiva la emisión de sustancias fenólicas dañinas para el material vegetal y favorecieron significativamente el desarrollo de las plantas *in vitro* obtenidas de segmentos uninodales (Borges, 2009).

Luego de un mes del establecimiento del cultivo *in vitro* en condiciones asépticas de los segmentos nodales usados como explantes, los seis clones mostraron un buen crecimiento y desarrollo en las vitroplantas, con tallos vigorosos y muchas hojas (Figura 2).

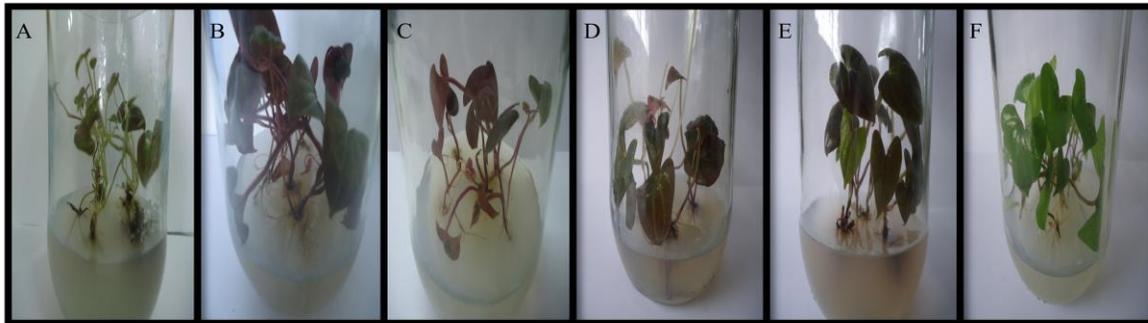


Figura 2. Clones de ñames establecidos *in vitro* un mes luego de la desinfección de los segmentos nodales usados como explantes: (A) clon D2, (B) clon D7, (C) clon D8, (D) clon (D11), (E) clon venezolano y (F) clon criollo colombiano.

5.2) Micropropagacion de los clones de ñame

Se han venido realizando estudios en donde se han establecido de forma exitosa la micropropagación de diferentes especies de *Dioscorea* a partir de segmentos nodales de una o dos yemas. Actualmente se conoce que el uso de estos explantes con yemas axilares proliferan de forma rápida en el cultivo (Das y col. 2013).

Se han utilizado diferentes explantes en diferentes investigaciones para la propagación *in vitro* de estas plantas. Algunos ejemplos de estas investigaciones son: Mahesh y col. (2010) trabajaron con *Dioscorea wightii* y propagaron la planta utilizando segmentos nodales como explantes. Chen y col. (2003) desarrollaron un protocolo para la propagación rápida *in vitro* de *D. zingiberensis* utilizando tallo como explantes y Poornima y col. (2007) utilizaron segmentos nodales para propagar *D. Oppositifolia* y *D pentaphylla*. En el presente trabajo de investigación se llevó a cabo la micropropagacion de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D11, clon colombiano y clon venezolano) a partir de segmentos nodales cultivados en medio MS (control), en medio con 1/5 de las sales de MS y medio con MS+ BA (0,5 g/L).

Los tratamientos que se utilizaron para el establecimiento de la micropropagacion de los seis clones de ñame resultaron muy favorables en la formación de nuevos brotes. En la segunda semana de cultivo las yemas de los seis clones comenzaron a desarrollarse en vástagos pequeños, y al transcurrir 8 de semanas se observaron plantas más vigorosas

aunque con diferencias con respecto a la longitud de los brotes entre cada uno de los tratamientos aplicados. (Figura 3).

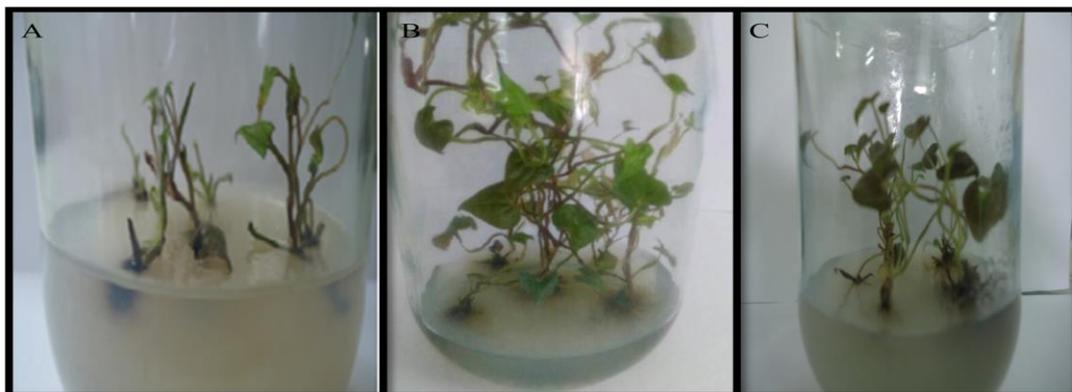


Figura 3. Vitroplantas de 8 semanas de edad, del clon D2 cultivadas en medio semisólido (A) en medio con MS suplementado con BA (0,5), (B) en medio con 1/5 de las sales de MS y (C) en medio MS (medio control).

En este proceso se estudiaron tres parámetros que son muy importantes en el establecimiento de la micropropagación: Número de brotes por explante, número de raíces por vitroplanta y longitud de los brotes.

El primer parámetro analizado es el número de brotes por explante, en donde se observa que en los tres tratamientos aplicados mostraron promedios similares (5 brotes por explante), en los clones D2, D7, D8, D11 y clon venezolano, contrario a esto el clon colombiano mostró un promedio de 7 brotes por explante cuando fue cultivado en el medio con MS+BA (0,5) en comparación a lo obtenido con los otros tratamientos en donde no hubo diferencias en el promedio de brotes obtenidos.

Las vitroplantas del clon D8 presentaron el menor promedio de brotes por explante (3,00) cuando estas fueron cultivadas en medio con 1/5 de las sales de MS, por lo que este clon no se vio favorecido su crecimiento y desarrollo en este medio de cultivo (Tabla 6).

En diversas investigaciones que se han realizado hasta hoy para optimizar la micropropagación de cualquier especie vegetal en general, no solo se desea obtener un gran número de brotes con numerosas hojas, sino también se desea lograr un mayor

número de raíces por vitroplanta, para garantizar que las plantas puedan sobrevivir a las condiciones de invernadero en la etapa de aclimatación, y puedan aprovechar los nutrientes necesarios que les permitirá adaptarse a ese nuevo medio ambiente. Por lo antes expuesto se tomó en cuenta el número de raíces que producían las vitroplantas de los seis clones de *Dioscorea* sp. cultivados bajo tres diferentes tratamientos.

Entre los tratamientos aplicados se encontró que en el medio con 1/5 de las sales de MS, el clon D11 mostró un promedio de 7 raíces por explante en comparación con los demás clones estudiados los cuales tuvieron promedios inferiores a éste. Esto permite inferir que la reducción de las sales en el medio favorece la producción de raíces. Por otro lado, en el medio con MS+BA (0,5) el clon D8 presentó un promedio de 2,81 raíces por explante; este valor resultó menor al encontrado en los demás clones en contraste a los demás tratamientos aplicados, por lo que este medio no resultó el más adecuado para producir mayor número de raíces entre los seis clones. (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de tres tratamientos en la micropropagación de 6 clones de ñame

Clones	Tratamiento	NB	NR	LB (cm)
Clon D2	MSC	4,75±0,25 a	6,00±0,47a	3,63±0,24 ab
	1/5 MS	4,25±0,48 a	6,75±0,21 a	4,50±0,35 b
	MS+ BA (0,5)	4,5±0,50 a	6,69±2,75 a	2,75±0,32 a
Clon D7	MSC	5,00±0,00 a	5,56±0,41 a	4,46±0,11 b
	1/5 MS	4,75±0,25 a	6,00±0,42 a	5,63±0,24 c
	MS+ BA (0,5)	3,5±0,86 a	5,38±0,68 a	2,25±0,17 a
Clon D8	MSC	5,00±0,00 a	5,56±0,41 b	5,25±0,82 a
	1/5 MS	3,00±1,08 a	5,89±0,98 b	6,13±0,48 a
	MS+ BA (0,5)	4,50±0,50 a	2,81±0,27 a	3,69±0,51 a
Clon D11	MSC	4,00±0,40 a	4,71±0,84 a	4,46±0,11 b
	1/5 MS	4,75±0,62 a	7,00±1,35 a	5,63±0,24 c
	MS+ BA (0,5)	4,50±0,29 a	4,06±0,31 a	2,25±0,17 a
Clon CC	MSC	5,00±0,00 a	5,13±0,59 a	6,44±0,79 b
	1/5 MS	5,00±0,00 a	5,19±0,27 a	5,56±0,51 ab
	MS+ BA (0,5)	7,00±0,91 b	4,19±0,31 a	3,50±0,20 a
Clon CV	MSC	5,00±0,00 a	4,56±0,33 a	5,06±0,41 b
	1/5 MS	5,00±0,00 a	5,50±0,73 a	4,31±0,06 b
	MS+ BA (0,5)	5,00±0,00 a	3,88±0,30 a	2,94±0,25 a

Efecto de tres tratamientos en la micropropagación de seis clones de ñame: Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC), 1/5 de las sales de MS y MS suplementado con 0,5 mg/L de Benciladenina (BA). La tabla indica los valores promedios a la izquierda y el error estándar del lado

derecho para cada uno de los tratamientos. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía ($\alpha=0,5$), el cual indicó la existencia de diferencias significativas entre los clones ($p<0,05$.) y entre tratamientos. Las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba a posteriori de Tukey ($\alpha=0,05$). NB: Número de brotes; NR: Número de raíces; LB: Longitud de los brotes.

En otros estudios realizados en la micropropagación de diferentes especies de *Dioscorea* han tomado en consideración la longitud de los brotes como un parámetro de crecimiento que ha mostrado ser de gran importancia cuando se desea optimizar las condiciones de los medios de cultivos que permiten la conservación *in vitro* de plantas.

En esta investigación se pudo observar que existen variaciones en el promedio obtenido en cada uno de los tres tratamientos estudiados, en donde en el medio con 1/5 de las sales de MS se obtuvieron brotes con la mayor altura, siendo el clon D8 el que mostró un promedio superior en comparación a los demás clones (6,13 cm) (Figura 4.). La menor longitud alcanzada por los brotes se encontró en el tratamiento con MS+BA (0,5) en donde los clones D7 y D11 presentaron un promedio de 2,25 cm de longitud. (Tabla 6).

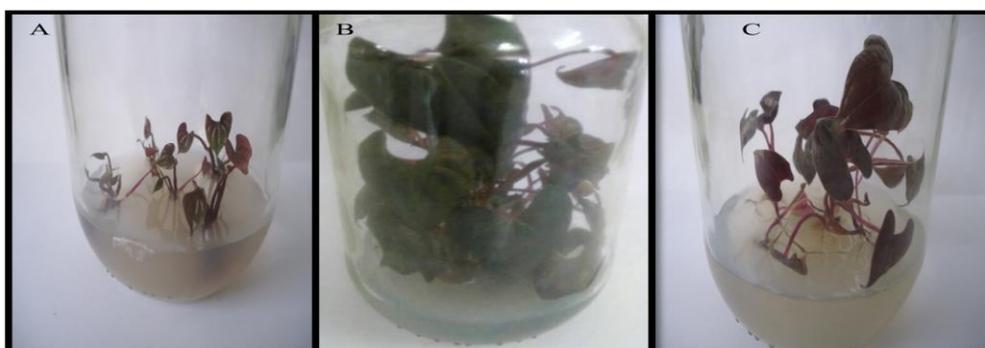


Figura 4. Vitroplantas del clon D8 con 2 meses de edad, cultivadas en medio semisólido (A) en medio con MS suplementado con BA (0,5), (B) en medio con 1/5 de las sales de MS y (C) en medio MS (medio control)

No se encontraron diferencias significativas en el número de brotes por explantes entre los clones D2, D7, D8, D11 y clon venezolano con respecto a los tratamientos aplicados, a excepción del clon colombiano en donde uno de los tratamientos mostró diferencias con respecto a los otros dos. En el número de raíces se encontró también que no existen diferencias significativas entre los tres tratamientos aplicados para cada uno de los clones estudiados, excepto en el clon D8 en donde se encontraron diferencias en el tratamiento con MS+BA (0,5) con respecto a los otros medios. A diferencia de los otros parámetros analizados, para la longitud de los brotes si se encontraron diferencias

significativas en los tratamientos que se aplicaron para los clones D2, D7, D11, clon venezolano y clon colombiano. El clon D8 fue el único que no mostró diferencias significativas en la longitud de los brotes con respecto a los tratamientos que se aplicaron.

Se han reportado que en los medios semisólidos se ha logrado inducir la proliferación de los brotes y multiplicación de vitroplantas con excelentes resultados (Behera y col. 2010 y Borges y col. 2011). En esta investigación se obtuvo que los tratamientos aplicados no tuvieron influencia en el número de brotes que se obtuvo para cada clon, pues no mostraron diferencias en los promedios y que estos mostraron ser similares entre sí (4,5-5,0 brotes por explante), excepto en el clon colombiano en donde en el tratamiento con MS+BA (0,5) se obtuvo el mayor promedio de brotes por explante (7,0) con diferencias significativas con respecto a los otros dos tratamientos aplicados.

En investigaciones similares, los mejores resultados para el número de brotes se han obtenido cultivando explantes en medio MS suplementado con BA pero a una concentración mayor a la usada en esta investigación y combinando otros reguladores de crecimientos (BA 1 mg/L, AG3 1 mg/L y Putrescina 2 mg/L) como lo hicieron Ramos y col. (2015), en donde evaluaron tres medios de cultivo para el establecimiento de la micropropagación de *D. coriacea*, *D. lehmannii*, *D. meridensis*, *D. polygonoides* y una especie comestible de *D. trifida*.

Por otra parte otro resultado similar fue el obtenido por Royero y col. (2007) en donde encontraron que en *D. alata* el uso de BA a una concentración de 0,5 mg/L, produce en promedio 4,90 brotes por explante, y al suplementarlo con 2 mg/L, se obtuvo un promedio de 5,75 brotes, es decir, que la proliferación de los brotes se ve favorecida cuando se adiciona esta citoquinina en los medios de cultivo. En cambio Mwirigi y col. (2010), en evaluaciones de MS suplementado con BA el crecimiento de explantes nodales de *Dioscorea* spp. observaron un desarrollo de brotes de 1,1 a concentraciones de 0,5 y 1 mg/L y recomiendan que para la formación de hojas es mejor utilizar 0,5 mg/L de BA. Además, el uso conjunto de BA a 0,5 mg/L y 0,02 mg/L, permitió el desarrollo de subcultivos de segmentos nodales de vitroplantas de *Dioscorea* sp. a las 6 semanas, permitiendo la formación de 2,1 brotes y 4,25 hojas en promedio por plántula (Mwirigi y col. 2010). Las citoquininas son las hormonas vegetales empleadas para la micropropagación, ya que

estimulan la división celular y por lo tanto el desarrollo de la yema o yemas pre-existentes en el microesqueje. La baja concentración de la citoquinina BA empleada en este trabajo y que arrojó altos índices de formación de brotes, nos puede indicar que estas variedades de ñame deben poseer valores endógenos relativamente altos de esta hormona. Las pocas diferencias encontradas entre los clones micropropagados, se deben probablemente a que la acción hormonal es influenciada por el genotipo (Perea y col. 2001).

Moreno (2016) estableció la micropropagación de 5 clones de *Dioscorea* sp (D2, D7, D8, clon colombiano y clon venezolano) obtuvo que el mayor número promedio de brotes por explantes fue de 3,89 en vitroplantas de clon venezolano, cultivadas en medio semisólido con las sales completas de MS y con diferencias estadísticamente significativas. También obtuvo que el clon colombiano y el clon D7 desarrollaron mayor número de brotes cuando fueron cultivados en medio con 1/5 de las sales de MS y bajo luz continua reportando 3,78 y 3,11 brotes por explantes respectivamente, y con diferencias significativas para dichos clones en los demás tratamientos. En comparación con la presente investigación se puede decir que se obtuvieron resultados muy diferentes a pesar de que se trabajó con 5 de los clones usados por este autor, en donde se demostró que no hubo diferencias significativas entre el número de brotes entre los tratamientos aplicados.

Borges y col. (2011) mencionan que no siempre la reducción de las sales es ideal para inducir algunos procesos tales como la multiplicación de los brotes. Ellos demostraron que una reducción de las sales MS, por debajo del 75% de su concentración original, trae efectos perjudiciales en la formación de nuevos brotes reportando 1,6 brotes por explante de 1,3 cm con las sales MS reducidas al 20% (1/5), mientras que con las sales MS al 75%, este valor incrementó a 2,8 brotes por explante de 3 cm.

De los resultados obtenidos en la longitud de los brotes, se puede decir que la reducción de las sales de MS a 1/5 juega un papel muy importante en la elongación de los brotes de los clones de ñame. La reducción de las sales en el medio de cultivo, tanto *in vitro* como *ex vitro* le ocasiona estrés a las plantas, debido a la escasez de nutrientes (Moreno 2016). Murashige (1962) planteó que el manejo de la concentración de las sales en el medio es ampliamente recomendado para estimular la formación de yemas y hojas, la

elongación de los vástagos producidos *in vitro* y el enraizamiento de las plantas como ya se mencionado.

De acuerdo a lo antes mencionado se puede decir que la reducción de la sales en el medio promovió el crecimiento rápido de los vástagos, en todos los clones estudiados, esto coincide con los resultados obtenidos por Cabrita (2014), donde obtuvo que luego de subcultivar brotes del clon colombiano en 1/5 de las sales de MS y suplementado con 30 g/L de sacarosa, obtuvo la mayor longitud promedio de brotes de 2,70 cm con diferencias significativas con respecto a las plántulas cultivadas en medios con reguladores de crecimiento. En estudios similares Moreno (2016), reportó que en la formulación con las sales reducidas a 1/5 de MS obtuvo la mayor elongación de los vástagos en cuatro de los cinco clones establecidos por este autor en donde el Clon D2 obtuvo la mayor longitud registrada (8,64).

5.3) Establecimiento de la organogénesis en seis clones de ñame

El éxito en los sistemas de regeneración *in vitro* de plantas recae en la buena elección del explante junto a una adecuada combinación de fitorreguladores y el proceso de regeneración eficiente y confiable. La finalidad de este trabajo fue establecer la organogénesis en seis clones de ñame a través de una combinación de fitorreguladores junto a un explante con alto potencial morfogenético, esto con el fin de obtener brotes múltiples y comparar la eficiencia de la regeneración *in vitro* por organogénesis, con la obtenida por micropropagación y así poder determinar cuál sistema de regeneración *in vitro* se va a emplear para mantener las vitroplantas de ñame en el banco de germoplasma (Figura 5).

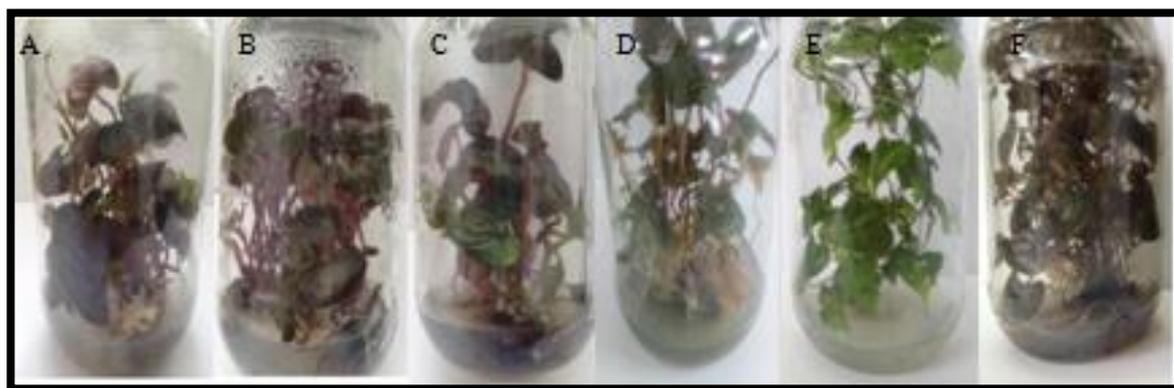


Figura 5. Vitroplantas de (A) clon D2, (B) clon D7, (C) clon D8, (D) D11, (E) clon colombiano y (F) clon colombiano.

(F) clon venezolano, de 4 meses de edad, micropropagadas en medio semisólido suplementado con 1 mg/L de BA y 0,5 mg/l de ANA.

Utilizando un medio de cultivo MS control (MSC, sin hormonas), y un medio MS suplementado con una combinación de 0,5 mg/L de ANA y 1 mg/L de BA se logró observar que cinco de los seis clones de ñame presentaron formación de una masa de células desorganizadas en proceso de desdiferenciación y rediferenciación (callo) en la base de los explantes, dos semanas después de haber iniciado el establecimiento del cultivo. En cambio, en el clon colombiano este callo en la base del explante comenzó a proliferar después de un mes de haber establecido el cultivo. Es importante destacar que cuando se formó el callo ya habían empezado a brotar los primeros vástagos. Los callos que se desarrollan cuando los explantes son cultivados en un medio con distintos niveles de auxina y citoquininas, interactúan con los fitorreguladores endógenos para llegar a un equilibrio para la formación de órganos, una vez llegado a esto la producción de callo se detiene (Cardozo, 2005).

Luego de 6,5 meses se evaluó el efecto de los tratamientos aplicados sobre el número de brotes formados (Tabla 7). El mayor número promedio de brotes por explante se obtuvo con el clon D2 (6,75) cultivado en el medio MS con 0,5 mg/L de ANA y 1 mg/L de BA. Por el contrario, el clon D11 presentó un promedio de 2,50 brotes por explante; esto indica que a pesar de que se llevó a cabo el proceso de formación de callo en este clon no hubo una mejor respuesta en el número de brotes observados. En el medio control no se obtuvieron diferencias en el promedio de brotes por explante (5,00).

El número de raíces observadas entre los tratamientos estudiados muestra que el medio MS control (MSC) resultó el más adecuado para la producción de raíces en los seis clones estudiados; el clon D2 mostró un promedio mayor de 6,00 raíces por explante con respecto a los demás clones. Los clones D11 y clon venezolano presentaron un promedio menor de 4,56 y 4,71 de raíces por explante respectivamente. En el tratamiento con MS suplementado con la combinación hormonal antes mencionada se observó una menor producción de raíces por explante en los seis clones estudiados, siendo el clon D7 el que obtuvo el menor promedio de raíces por explante cuando fue cultivado en el medio MS suplementado con la combinación hormonal en comparación con los demás clones. Todos

los clones de ñame mostraron diferencias significativas con los tratamientos que se les aplicaron (Tabla 7).

Para la longitud de los brotes los clones D2 y D7 presentaron la mayor longitud promedio reportada con 7,50 y 7,13 cm respectivamente, diferente a esto el clon D8 mostró un promedio menor (2,25 cm) en medio MS con ANA (0,5) y BA (1). En los medios control no hubo diferencias en los promedios observados, excepto en el clon colombiano donde se observó un promedio de 6,44 cm de longitud promedio de los brotes (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de dos tratamientos en la inducción de organogénesis de seis clones de ñame.

Clones	Tratamiento	NB	NR (cm)	LB (cm)	LC (cm)
Clon D2	MSC	4,75±0,25 a	6,00±0,47 b	3,63±0,24 a	0,00±0,00 a
	ANA(0,5)+BA(1)	6,75±0,85 a	2,83±0,28 a	7,50±1,32 b	4,38±1,54 b
Clon D7	MSC	5,00±0,00 b	5,56±0,41 b	4,46±0,11 a	0,00±0,00 a
	ANA(0,5)+BA(1)	4,25±0,25 a	1,88±0,31a	5,00±0,00 a	2,75±0,48 b
Clon D8	MSC	5,00±0,00 a	5,56±0,41 b	5,25±0,82 a	0,00±0,00 a
	ANA(0,5)+BA(1)	3,25±1,18 a	2,00±0,40 a	2,25±0,85 a	3,25±0,49 b
Clon D11	MSC	4,00±0,40 b	4,71±0,84 b	4,46±0,11 a	0,00±0,00 a
	ANA(0,5)+BA(1)	2,50±0,29 a	2,00±0,59 a	4,55±0,17 a	2,38±0,21 b
Clon CC	MSC	5,00±0,00 a	5,12±0,59 b	6,44±0,79 b	0,00±0,00 a
	ANA(0,5)+BA(1)	5,00±0,00 a	4,56±0,33 a	5,06±0,41 a	1,23±0,34 b
Clon CV	MSC	5,00±0,00 a	4,56±0,33 b	5,06±0,41 b	0,00±0,00 a
	ANA(0,5)+BA(1)	3,75±0,75 a	2,25±0,48 a	4,25± 0,10 a	2,20±0,24 b

Efecto de dos tratamientos en la inducción de la organogénesis de seis clones de ñame: Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC), y MS suplementado con 0,5 mg/L de ácido naftalenoacético (ANA) y 1mg/L de Benciladenina (BA). La tabla indica los valores promedios a la izquierda y el error estándar del lado derecho para cada uno de los tratamientos. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de una vía ($\alpha=0,5$), el cual indicó la existencia de diferencias significativas entre los clones ($p<0,05$.) y entre tratamientos. Las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba a *posteriori* de Tukey ($\alpha=0,05$). NB: Número de brotes; NR: Número de raíces; LB: Longitud de los brotes; LC: Longitud del callo.

En los medios MS suplementados con ANA (0,5) y BA (1) se observó inducción de callo en todos los clones de ñame (Figura 6), siendo el clon D2 el que formó callos de mayor tamaño (4,38 cm), a diferencia del clon colombiano que mostró un tamaño promedio inferior de 1,23 cm. Estadísticamente se observó que hubo diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en todos los clones.

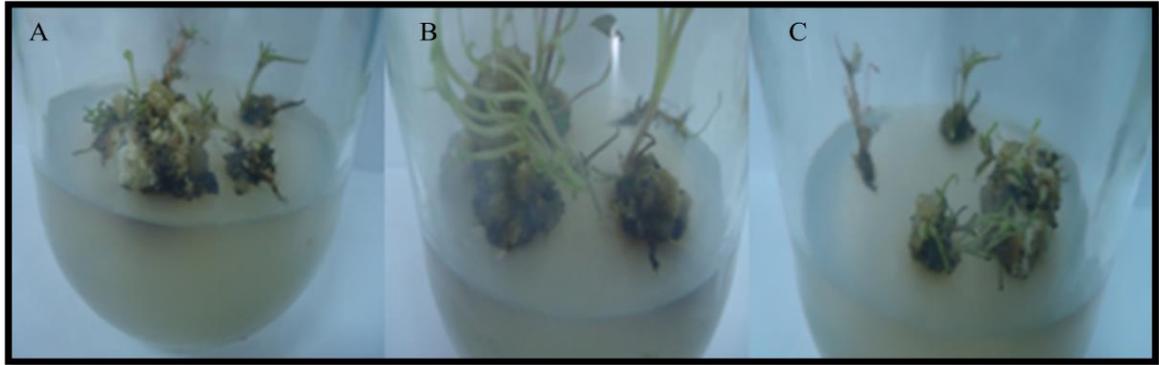


Figura 6. Formación de callo en (A) clon D2, (B) clon D11 y (C) clon venezolano de 6 semanas de edad en medio MS semisólido suplementado con 1 mg/l de BA y 0,5 mg/l de ANA e incubados bajo luz blanca continua.

Es conocido que cuando los explantes se cultivan en un medio donde la relación auxina:citoquinina es intermedia, el tejido responde con la formación de callo. La posterior morfogénesis en este callo, será producto de la interacción entre las concentraciones añadidas de estas hormonas y las concentraciones endógenas en el tejido usado como explante, y por lo tanto, depende del genotipo (Thorpe, 2014). Los clones de ñame estudiados mostraron diferencias en el número de brotes observados, siendo el clon D2 el que mejor respondió al tratamiento con la combinación hormonal empleada. Se han reportado trabajos con otras especies de ñame (*D. oppositifolia*) donde se utilizaron segmentos nodales como explantes cultivados en medio MS suplementado con las mismas combinaciones empleadas en el presente trabajo, observándose que el 90% de los explantes mostraban proliferación (Behera y col., 2009). También Royero y col. (2007), optimizaron la micropropagación en *D. alata* observando un mayor número promedio de brotes por explante en vitroplantas cultivadas en medio semisólido con 0,5 mg/l de ANA y 1 mg/l de BA. Moreno (2016) utilizó cinco de los clones estudiados en esta investigación (D2, D7, D8, clon colombiano y clon venezolano) usando la misma concentración hormonal y obtuvo los mejores resultados en medios semisólidos suplementados con 1 mg/l de BA y 0,5 mg/l ANA, y al igual que en este trabajo se indujo la formación de callo.

En este mismo sentido, Asha y Nair. (2007), demostraron que las citoquininas son efectivas para promover el inicio directo de brotes en los explantes foliares de *D. pentaphylla*, *D. hamiltonii*, *D. wightii* y *D. intermedia* seguido por los explantes de peciolo en *D. bulbifera* y *D. hispida*. También reportan que el efecto sinérgico de BA (3 mg / L),

Cinetina (1 mg / L) y ANA (1 mg /L) indujo el desarrollo de 12 brotes en *D. pentaphylla* a partir de explantes de hojas.

Para el enraizamiento de estos seis clones, se obtuvo el mayor número promedio de raíces por explante en el medio control. Esto quizás se puede atribuir a que las plantas en los medios suplementados con BA y ANA retardan su crecimiento por el estadio intermedio de callo, y a que a partir de las células del callo es de donde se obtienen las nuevas plantas. A diferencia de lo obtenido en este trabajo, Behera y col. (2009) observaron que en *D. opossitifolia* se produjo un enraizamiento profuso cuando se cultivaron en medios MS suplementados con 2 mg/ L de ANA en combinación con 0,2 y 0,5 mg /L de BA.

Moreno (2016), evidenció que el crecimiento de raíces de las vitroplantas de cinco clones de ñame fue favorable en medios semisólidos y líquidos suplementados con 1 mg/l de BA y 0,5 mg/l ANA. Poornima y col. (2007), reportaron que se observó un enraizamiento eficiente en medio MS con 0,5 mg/L de ANA después de 30 días. Quintero y col. (2003) determinaron que el uso de ANA para el enraizamiento de ñame (*Dioscorea* spp.) depende del genotipo, obteniendo la formación de raíces con dosis de 0,3 mg/L, 0,6 mg/L y 0,9 mg/L de ANA a los genotipos identificados como 005, 003 y D22, respectivamente. Aunque, Perea y Buitrago (2000) obtuvieron resultados exitosos suplementando el MS con sólo 0,5 mg/L de ANA.

Por otro lado, la mayor longitud de los brotes se obtuvo en los medios controles en comparación con los medios suplementados con 1 mg/L de BA y 0,5 mg/L ANA, excepto para el clon D2 donde las plantas mostraron mayor longitud cuando se cultivaron en medio con la combinación hormonal antes mencionada. Esto puede ser debido, como se explicó anteriormente, a que las concentraciones endógenas de auxinas presentes en el clon D2 pudieron interactuar con el contenido hormonal que se agregó al medio y de esta forma se promovió en aumento en la longitud de los tallos de estas vitroplantas. Royero y col. (2007), reportaron los mismos resultados para *D. alata*. en donde la mayor longitud se encontró en los medios controles.

Por último, es importante destacar que se logró inducir la organogénesis indirecta en los seis clones de ñame, evidenciada por la presencia de una masa de células en la base de los explantes y que a través de esta masa celular denominada callo se logró obtener la

regeneración de plantas nuevas. De forma similar, Belarmini y del Rosario. (1991), lograron inducir callo y la organogénesis indirecta en tres especies de ñame, *D. esculenta*, *D. rotundata* y *D. alata* L usando de igual forma la combinación hormonal de 1 mg/l de BA y 0,5 mg/L ANA.

Chen y col. (2003), también desarrollaron un protocolo para la propagación *in vitro* de *D. zingiberensis* vía organogénesis indirecta, donde usaron tallo como explantes al igual que en esta investigación. De igual forma, lograron inducir la formación de callo en medio MS suplementado con 2 mg/ L de BA y 1 mg/ L de ANA en 30 días, es decir, que usaron el doble de las concentraciones que se empleo en la presente investigación y de igual forma lograron la inducción de callo organogénico pero en un tiempo mayor.

También se ha reportado la regeneración de plantas de ñame vía organogénesis directa (Asha y Nair. 2007). Ellos lograron la regeneración directa de varias especies de ñame (*D. pentaphylla*, *D. hamiltonii*, *D. wightii*, *D. intermedia*, *D. bulbifera* y *D. hispida*) usando un medio MS suplementado con BA (3 mg/L), K (1 mg/L) y ANA (1 mg/L). Similarmente Royero y col. (2007) y Behera y col. (2009) usaron 1 mg/l de BA y 0,5 mg/l ANA y lograron la regeneración *in vitro* de *D. alata* y *D. oppositifolia* respectivamente.

Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten decir que la regeneración *in vitro* de los seis clones de ñame vía micropropagación, resultó ser más favorable que a través de la organogénesis indirecta, pues por medio de esta técnica se obtuvieron plantas regeneradas en menor tiempo (4 meses), en cambio con la organogénesis indirecta se obtuvieron plantas regeneradas en un tiempo mayor (6 meses y medio). Es importante destacar que se obtuvo un mayor número de brotes y raíces en los medios de micropropagación con respecto a los medios de organogénesis, siendo el medio MS con 1/5 de las sales el medio de cultivo más favorable para todos los clones pues mostró un número significativo de brotes por explantes, mostraron un crecimiento optimo y las plantas produjeron un enraizamiento que les permitió aprovechar los nutrientes del medio y así crecer y desarrollarse. Además, con la reducción de las sales MS a 1/5 de su concentración también disminuyen los costos de producción y mantenimiento.

En este sentido se usará la micropropagación como método de regeneración *in vitro* para el establecimiento de los 6 clones de ñame, y el medio MS con 1/5 de las sales para la conservación y resguardo del banco de germoplasma, concretándose, además del beneficio de la conservación de la biodiversidad de esta importante especie vegetal, un aporte importante a la seguridad alimentaria de Venezuela, dado que a través de esta herramienta biotecnológica se pueden proporcionar semillas sanas, libres de patógeno, en corto tiempo y en espacio reducido con el fin de ofrecérselas a los productores de este rubro y fomentar la producción nacional y el consumo entre la población venezolana. Además, de esta forma se puede promover la inclusión de estos materiales en programas de mejoramiento, con la intención de obtener el mayor beneficio de las potencialidades de tan importante cultivo.

5.4) Establecimiento del banco de germoplasma de ñame (*Dioscorea* sp.)

Antes del establecimiento del banco de germoplasma de ñame se realizó una recolección de los datos de pasaporte que fueron proporcionados mayormente por el INIA Miranda y demás donadores de estos materiales. Estos datos se resumen en la Tabla 8 y son de gran importancia como punto de partida cuando se desea hacer una caracterización del germoplasma vegetal y análisis filogenéticos.

Tabla 8. Algunos descriptores de pasaporte reportados para los clones de ñame incorporados en el banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.

Nombre de la accesión	Nombre común	Tipo de material recibido	Procedencia	Ubicación geográfica	Proveedor
D2	Ñame morado	Tubérculos	Sector Acevedo, Edo. Miranda	10°24'05.0" N 66°18'00.6" W	INIA-Miranda
D5	Ñame Gigante	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
D6	Pata de Danta Blanco	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
D7	Ñame largo blanco	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
D8	Ñame plano blanco	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
D9	Ñame Redondo	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
D10	Ñame Papa	Tubérculos	Patanemo. Sector La Primavera. Puerto Cabello, Edo. Carabobo	10°24'54.3"N 67°54'36.3"W	INIA-Miranda
D11	Ñame Diamante 22	Tubérculos	Sector Acevedo, Edo. Miranda	10°24'05.0" N 66°18'00.6" W	INIA-Miranda

D12	Ñame Concha Negra	Tubérculos	Patanemo. Sector La Primavera Puerto Cabello, Edo. Carabobo	10°24'54.3"N 67°54'36.3"W	INIA- Miranda
D13	Ñame concha de coco	Tubérculos	Cúpira, Edo. Miranda	10°09'38.9"N 65°41'53.5"W	INIA- Miranda
Clon venezolano	Criollo venezolano	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA- Miranda
Clon colombiano	Criollo colombiano	Tubérculos	Universidad Pontificia Bolivariana, sede Monteria, Colombia	8°48'16.9" N 75°51'02.7" W	Ing. Eder Durango
Ñame venenoso	Ñame venenoso	Tubérculos	Sector Acevedo, Edo. Miranda	10°24'05.0" N 66°18'00.6" W	INIA- Miranda

Cada unos de estos materiales donados fueron establecidos (a partir de tubérculos) y mantenidos en el vivero del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela. Para esto, se tomó en cuenta el ciclo vegetativo de la planta, el cual está comprendido por: una etapa de latencia de los tubérculos, la germinación de los brotes el crecimiento vegetativo, la formación de los tubérculos, el marchitamiento de las plantas y la cosecha de los tubérculos (Moreno, 2016). En el periodo de latencia de estos clones de ñame, se mantuvieron en condiciones de invernadero durante 4 meses, esto coincide con lo reportado por Rodríguez en el 2000 en donde dice que el periodo de latencia normal de estas plantas es de aproximadamente 4 meses. Estas condiciones favorecieron en algunos clones la aparición de los primeros grelos o brotes y coincide con lo reportado por Moreno (2016).

Aproximadamente 2 semanas luego de la siembra de estos tubérculos se comenzó a observar los primeros brotes de estas plantas, esta primera etapa de desarrollo se caracteriza por ser lenta (Rodríguez, 2000) en donde se evidenciaron las primeras hojas delgadas, con epidermis cerosa en la mayoría de los clones y de color verde, aunque en otros clones estas fueron moradas como el caso del clon D7. El tallo de estas plantas es delgado en esta primera fase de desarrollo. En los meses continuos al crecimiento de las plantas se observó que este ocurría de una forma exponencial, en donde los tallos de las plantas eran más gruesos y alados. Fue durante la etapa de crecimiento vegetativo (etapa adulta) cuando se realizó la caracterización morfológica para el tallo y las hojas.

Luego de un mes después de que empezaron a brotar las plantas de ñame fue necesario colocar algún tipo de soporte a fin de que los tallos o bejucos no se arrastren. Según Rodríguez (2000) el soporte ofrece una mejor disposición de las hojas, disminuye el

autosombreo entre ellas, incrementa su duración y la producción de nuevo follaje, lo cual aumenta el rendimiento de tubérculos. Además contribuye a disminuir la incidencia de las enfermedades, ya que facilita la ventilación que disminuye la humedad relativa. Los soportes pueden ser individuales, como estacas de madera, o caña brava de 2 m de alto que se colocan verticales junto a la planta.

Después de 7 meses, las plantas empezaron a mostrar hojas y tallos amarillentos, que son signos de marchitamiento y que indica que está empezando la fase de senescencia de estas plantas, tan pronto estos tallos y hojas estén secos se debe proceder a la cosecha de los tubérculos. Según los reportes realizados por Moreno y col. (2012), durante toda esta etapa toda la energía de la planta se transfiere al tubérculo, el follaje se torna amarillento y muere por vejez o sequía o una combinación de estos factores.

En la época de cosecha, 8 meses de cultivo (Noviembre- Diciembre, según Reina, (2012)) se realizó la caracterización de los tubérculos, en donde se pudo apreciar el color de la pulpa de los tubérculos de cada uno de los seis clones establecidos en el vivero. La cosecha de estos tubérculos generalmente se lleva a cabo de forma manual, con ayuda de algunas herramientas si es necesario, para evitar que se produzcan heridas o ruptura en los tubérculos (Yam, 2011). Estos tubérculos fueron guardados en bolsas de papel previamente identificadas y conservados en un área seca a 25 °C para facilitarles el grelado y poder usarlos para el próximo cultivo y así mantener el banco de germoplasma.

5.5) Caracterización Morfológicas de los seis clones de ñame del banco de germoplasma de Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.

Para la caracterización morfológica de los seis clones de ñame (*Dioscorea* sp.), se tomaron los descriptores con mayor poder discriminativo reportados por Moreno (2016), los cuales aportaron información importante para evaluar la diversidad morfológica de estos clones. Dentro de los caracteres morfológicos que definen las características de este género se utilizaron los descriptores morfológicos relacionados con el tallo maduro, los descriptores morfológicos relacionados con la hoja madura y los descriptores morfológicos relacionados con el color de la pulpa de los tubérculos.

5.5.1) Descriptores morfológicos relacionados con el tallo maduro.

Los tallos de las plantas de ñame comparten muchas características comunes entre ellos; todos son verdes y presentan alas en los tallos maduros, sin embargo hay

características que los diferencian (Tabla 9) entre ellas se puede mencionar la presencia de cera en el tallo y el color de las alas del tallo maduro. Aunque todos son alados se diferencian en el color de las alas del tallo, D2 y D7 presentan alas de color morado, los clones D11, CV y CC presentan alas de color verde y D8 presenta alas de color verde con el borde morado.

Tabla 9. Descriptores relacionados con los tallos de los seis clones de ñame

Características	Clones					
	D2	D7	D8	D11	CC	CV
Ausencia/presencia de cera en el tallo maduro	Ausente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Ausencia/presencia de alas en el tallo maduro	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente	Presente
Color de las alas del tallo maduro	Morado	Morado	Verdes con bordes morados	Verde	Verde	Verde

Según Yam (2011) y Leblanc y Arce. (2007) las variedades de *D. alata* se caracterizan por presentar un tallo verde y con alas membranosas. Los tallos de los clones analizados en el presente trabajo comparten las características de presentar tallo verde y ser alados (Figura 7). Las alas en los tallos de estas plantas son adaptaciones que favorecen el hábito trepador (Dumet y Ogunsola, 2008).



Figura 7. Detalle del color del tallo y del color de las alas del tallo del clon D7

Las variedades de ñame pueden presentar variaciones en el color de las alas de los tallos según reporte realizados por Moreno (2016). Esto coincide con las características encontradas en la presente investigación para los clones D2, D7, D8, CV y CC.

5.5.2) Descriptores morfológicos relacionados con las hojas maduras.

Los clones de ñame presentan también similitudes en la morfología de las hojas maduras, entre las que se pueden mencionar: hojas simples, de color verde, con bordes enteros y ápices puntiagudos, aunque son muchas las características que diferencian los clones estudiados (Tabla 10).

Las hojas maduras de los clones de ñame estudiados crecen generalmente en disposición opuesta al tallo, excepto en el clon D2 en donde las hojas crecen en disposición alterna en la base y opuesta hacia arriba. González (2012), describe que la posición de las hojas en el tallo es opuesta o alterna, y en ocasiones varía en una misma planta, esto coincide con las características encontradas en los clones estudiados.

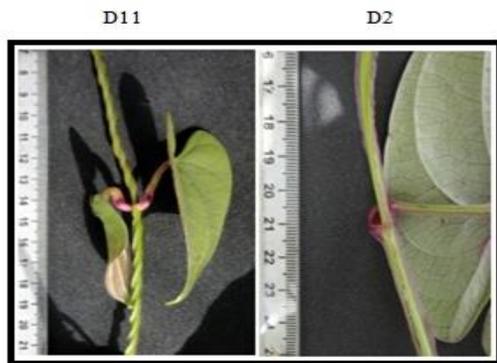


Figura 8. Disposición de las hojas en el tallo del clon D11 y D2

La forma de las hojas de los clones de ñame estudiados varía entre cordiforme, sagitifforme ancha y sagitifforme larga (Tabla 10). El color de la nervadura de las hojas generalmente es de color verde en el haz y en el envés, en cambio en el clon colombiano se encontró que presenta nervaduras de color amarillo. Se ha reportado que en algunas variedades pueden encontrarse diferencias entre las formas de las hojas y los colores en las nervaduras. Las hojas pueden ser sagitifformes y cordiforme y nervaduras verdes, moradas y amarillas (Leblanc y col., 2007).

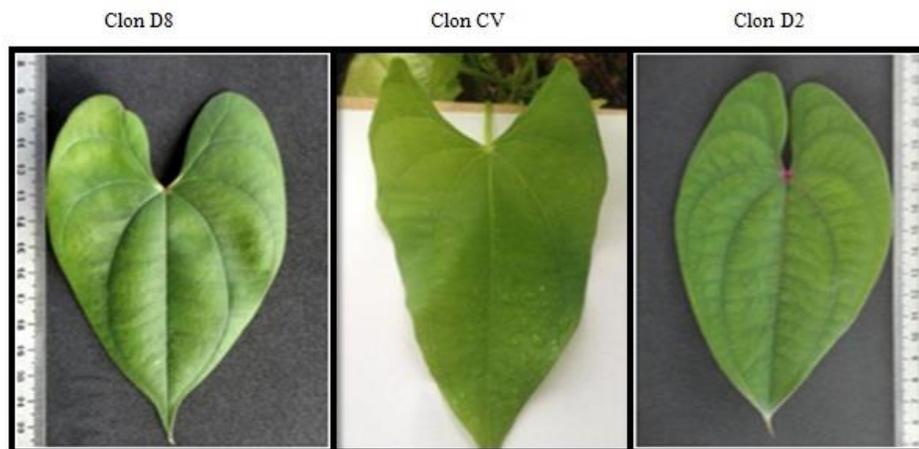


Figura 9. Forma de la hoja del clon D8, clon venezolano y clon D2.

Se encontró también que el color de los pecíolos y el color de las alas de los pecíolos de las hojas maduras presenta variaciones entre los clones estudiados, en donde se encontró que los clones D2 y D11 tienen el pecíolo verde con ambas puntas de color morado y alas de color verde con bordes morados; los clones D7 y D8 presentan pecíolos de color verde y morado en la base con alas color verde con bordes morados al igual que los clones D2 y D11; y para los clones venezolano y clon colombiano los pecíolos son de color verde con alas verdes.

Estos resultados mostraron coincidencia con lo reportado por Moreno (2016), donde obtuvo los mismos resultados para los clones D2, D7, D8, clon venezolano y clon colombiano, que de igual forma fueron caracterizados a nivel morfológico.

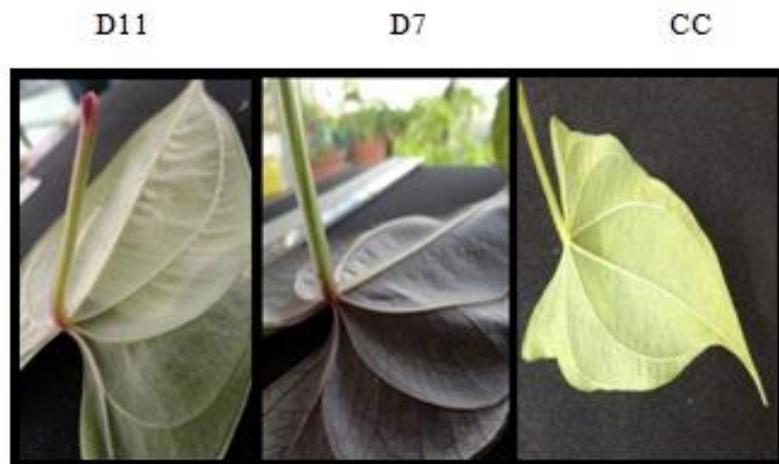


Figura 10. Detalle del pecíolo de los clones D11, D7 y CC.

Tabla 10. Descriptores relacionados con las hojas de los seis clones de ñame.

Características	Clones					
	D2	D7	D8	D11	CC	CV
Posición de las hojas Maduras	Hojas alternas en la base/ opuestas arriba	Opuestas	Opuestas	Opuestas	Opuestas	Opuestas
Color de la nervadura de la hoja madura (Haz)	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarilla	Verde
Color de la nervadura de la hoja madura (envéz)	Verde	Morada	Verde	Verde	Amarilla	Verde
Forma de la hoja madura	Sagitiforme Ancha	Sagitiforme Ancha	Cordiforme	Sagitiforme larga	Sagitiforme larga	Sagitiforme larga
Color de peciolo de la hoja	Todo verde, morado en ambas puntas	verde todo, con la base morada	verde todo, con la base morada	Todo verde, morado en ambas puntas	Verde	verde
Color del ala del peciolo de la hoja madura	Verde con bordes morados	Verde con bordes morados	Verde con bordes morados	Verde con bordes morados	Verde	Verde

5.5.3) Descriptores morfológicos relacionados con los tubérculos.

El color de la pulpa de los tubérculos es una característica muy importante debido a que permite evaluar la diversidad morfológica entre las variedades de ñame. De los clones de ñame estudiados los clones D7 y CC mostraron una coloración amarillenta, los clones D8 y CV presentaron una coloración blanco amarillento, el clon D11 por el contrario presentó una coloración blanca. El tubérculo del clon D2 es el más resaltante entre todos los clones debido a que la pulpa es de color morado, esto se debe a un alto contenido de antocianinas presentes en estos tubérculos (Figura 11), (Tabla 11).



Figura 11. Color de la pulpa de los tubérculos de los clones (A) D2, (B) D7, (C) D8, (D) D11, (E) clon colombiano y (F) clon venezolano.

Tabla 11. Descriptores relacionados con los tubérculos de los seis clones de ñame.

Características	Clones					
	D2	D7	D8	D13	CC	CV
Color de la pulpa en la sección transversal del centro del tubérculo	Morado	Amarrillo	Blanco amarillento	Blanco	Amarillo	Blanco amarillento

Los resultados obtenidos en la caracterización de la pulpa de los tubérculos, coinciden con lo reportado por Moreno (2016) en donde caracterizó la pulpa de cinco de los seis clones estudiados en el presente trabajo (D2, D7, D8, Clon colombiano y clon venezolano) y obtuvo los mismos resultados. Para el clon D11 es el primer reporte que se realiza.

Como se mencionó anteriormente, de los resultados obtenidos en el trabajo de Moreno (2016), se escogieron los descriptores que se aplicaron en la presente investigación. Las características morfológicas aquí detalladas, también coinciden con lo reportado por Castillo y col. (2010) quienes realizaron la caracterización morfológica de ocho cultivares de ñame (*Dioscorea alata* L.) establecidos en los campos de INIA-Barinas, seleccionando 17 variables de la lista de “Descriptores para el ñame (*Dioscorea* spp.)” (IPGRI/IITA, 1997).

Los descriptores morfológicos para cada clon se resumen en las “Cartillas de Presentación” donde se agrupan todos los resultados obtenidos en esta investigación y que constituyen un aporte muy importante ya que constituyen el documento de identificación de

cada clon y que ayudarán a evitar confusiones y repeticiones en la caracterización de la biodiversidad del ñame venezolano.

5.6) Estimación de la variabilidad genética de seis clones de ñame utilizando marcadores moleculares RAPD.

5.6.1) Aislamiento de ADN

El método de Doyle y Doyle (1990) modificado por Oropeza y col. (2006) permitió obtener ADN de buena calidad y pureza (Tabla 12). Gracias a las modificaciones realizadas por estos autores al protocolo, se eliminó la contaminación producida por el ARN con la adición de un paso con RNAsa “A”, y a través de los siguientes pasos, tratamiento con solución limpiadora de oligosacáridos (76% en 10 mM de acetato de amonio (NH₄COO)) y la precipitación con acetato de amonio 7.5 M, se logró eliminar los oligosacáridos asociados a estas especies que impiden la purificación y posterior amplificación del ADN.

También en la Tabla 12 se pueden apreciar las absorbancias a 260 y 280 obtenidas para cada uno de los 6 clones, en donde se muestra que los valores de pureza 260/280 están en un rango de 1,12-1,61. Estos valores son menores a los reportados por Sambrook y Russell (2001) quienes aseveran que un protocolo de extracción de ADN resulta ser eficiente si las muestras presentan una relación de absorbancias a 260/280 entre 1,8-2. Sin embargo, aunque la relación de absorbancia de las muestras de ADN obtenidas para los clones estudiados están por debajo a lo reportado por estos autores, se obtuvo suficiente cantidad de ADN relativamente puro, como se puede evidenciar en la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (Figura 12) en donde se muestra una banda nítida de 21226 pb para cada clon, correspondiente al ADN total.

Tabla 12. Valores de concentración y pureza de ADN de seis clones de ñame

Muestra	Abs 260	Abs 280	Abs		
			260/280	µg de ADN	ADNxFD
D2	0,026	0,021	1,238	0,879	260
D7	0,025	0,018	1,389	0,925	250
D8	0,062	0,053	1,17	1,992	620
D11	0,056	0,05	1,12	1,722	560
CCV	0,073	0,051	1,431	2,756	730
CCC	0,021	0,013	1,615	0,853	210

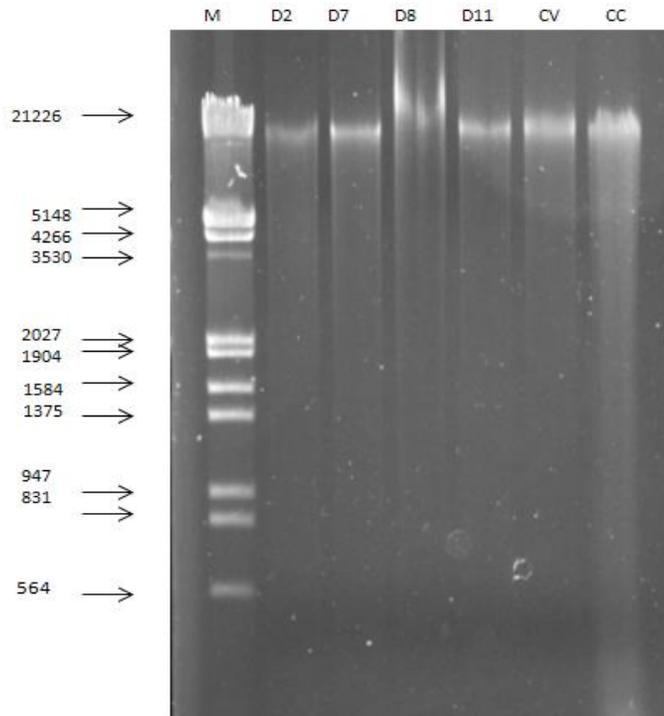


Figura 12. Integridad del ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D11, CC, CV) en un gel de agarosa al 0,8 %. M: marcador de talla molecular Lambda DNA/EcoRI+ HindIII.

Oropeza y col. (2006) y Marín y col. (2012), también usaron este protocolo para la extracción de ADN, y lograron amplificar de manera eficiente el ADN de vitroplantas de ñame (*Dioscorea alata*). Moreno (2016), reportó que las muestras de ADN obtenidas para seis clones de ñame estudiados (D2, D7, D8, D13, clon colombiano y clon venezolano), mostraban valores menores a 1,8-2 pero obtuvo suficiente cantidad de ADN y comprobó su integridad a través de un gel de agarosa al 0,8% resultando bandas nítidas de 21226 pb; resultados que coinciden con lo obtenido en esta investigación.

5.6.2) Análisis RAPD para seis clones de ñame.

Por medio del protocolo establecido por Demeke y col. (1996), para las concentraciones apropiadas de cada uno de los componentes de la reacción de amplificación, y las condiciones de ciclado establecidas por William y col. (1993), se logró obtener patrones de amplificación para cada una de las muestras de los seis clones de ñame. Se utilizaron 10 iniciadores arbitrarios de la serie OPA y OPB, que permitieron una

amplificación eficiente en cada uno de los clones estudiados, generando la huella digital para cada uno de ellos.

La amplificación del ADN genómico de cada uno de los clones presentó un gran número de bandas altamente reproducibles y estables, donde cada uno de los iniciadores mostró un patrón diferente de bandas amplificadas como se observa en la tabla 13, excepto los iniciadores OPA 01 y OPA 09 en donde se obtuvo el mismo patrón de bandas amplificadas. También, se encontró que para cada iniciador utilizado, hubo polimorfismo entre los fragmentos amplificadas, en donde con el iniciador OPA 07 se obtuvo mayor número de fragmentos polimórficos (13 bandas) mientras que con el iniciador OPA 14 se obtuvo el menor número de fragmentos polimórficos (6 bandas).

Los productos amplificadas en general, presentaron un rango de tamaño comprendido en el intervalo de 92,2 a 5.333,5 pb. Los fragmentos obtenidos con los iniciadores de la serie OPA presentaron un patrón de bandas comprendidas entre 92,2-5333,5 pb. Los fragmentos obtenidos con los iniciadores de la serie OPB presentaron un patrón de bandas de 231; 0- 3930,9 pb.

Tabla 13. Número total de fragmentos amplificadas por iniciador de 10 pb, rango de tamaño y fragmentos amplificadas, en 6 clones de plantas de ñame.

Primer	Secuencia del primer 5'→3'	Fragmentos amplificados	Fragmentos polimórficos	Rango de tamaño de las bandas (pb)
OPA 01	CAGGCCCTTC	64	7	328,4-4910,4
OPA 02	TGCCGAGCTG	49	12	92,2-3690
OPA 03	AGTCAGCCAC	85	11	188,8-3269,1
OPA 04	AATCGGGCTG	91	7	223,5-4420,4
OPA 07	GAAACGGGTG	101	13	186,3-5333,5
OPA 09	GGGTAACGCC	64	7	226,4-3091,2
OPA13	CAGCACCCAC	99	7	564,0-2727,7
OPA14	TCTGTGCTGG	51	6	564,0-5046,2
OPB 05	TGCGCCCTTC	41	9	336,1-3930,9
OPB 07	GGTGACGCAG	72	9	213,0-3843,1

En la tabla 14, se resumen los resultados obtenidos en la caracterización molecular de los seis clones de ñame, con un total de 717 fragmentos amplificados, un promedio de 71,7 fragmentos obtenidos por iniciador, observándose 628 bandas monomórficas y 89 bandas polimórficas, lo que representó el 12,41 del total. También se estimó que el promedio de fragmentos polimórficos fue de 8,9.

Tabla 14. Resumen de los productos de amplificación por RAPD de los seis clones de ñame.

Descripción	RAPD
Número total de fragmentos amplificados	717
Número de bandas monomórficas	629
Número de bandas polimórficas	88
Porcentaje de polimorfismos	12,27
Número de iniciadores usados	10
Promedio de polimorfismos por iniciador	8,8
Promedio de número de fragmentos por iniciador	71,7
Rango de Tamaño de los fragmentos amplificados	92,2-5333,5

En la figura 13 se observa el patrón de bandas obtenido con el iniciador OPA 01, donde los clones D7, D8 y D11 presentan el mismo patrón de bandas. Los clones D2 y CV presentan otro patrón de bandas y la ausencia de la banda de 947 pb que es muy notoria. El CC presenta un patrón de bandas totalmente diferente a los anteriores. Con el iniciador OPA 02 se pueden diferenciar la totalidad de los clones; en donde cada uno de los clones presenta un patrón diferente (figura 13).

En la figura 14 se puede notar que con el iniciador OPA 03 los clones D8 y D11 presentan el mismo patrón de bandas, también el clon D7 presenta un patrón similar, pero con ausencia de la banda de 1.904 pb. Los clones D2 y CV presentan otro patrón de bandas y el CC presenta un patrón de bandas diferente a los demás clones.

Con el iniciador OPA 04 los clones D2, D11 y CV muestran el mismo patrón de bandas. Los clones D7 y D8 presentan otro patrón de bandas con ausencia de la banda de 2.876 pb. El CC mostró un patrón de bandas diferente a los demás clones (figura 14). Con

el iniciador OPA 07 (figura 15) se pueden diferenciar la totalidad de los clones; en donde cada uno de los clones presentan un patrón diferente

En la figura 16, se muestra que con el iniciador OPA 09 los clones D2, D11 y CV muestran el mismo patrón de bandas. Los clones D7 y D8 muestran otro patrón con ausencia de la banda de 1.250 pb que es muy notoria en este perfil. El CC muestra un patrón diferente a los demás clones.

Con el iniciador OPA13 los clones D7, D8 y D11 presentaron el mismo patrón de bandas, los clones D2 y CV presentaron un patrón diferente con ausencia de la banda de 2623,2 pb. En la figura 17, con el iniciador OPA 14 se observa que los clones D7 y D8 tienen el mismo perfil de bandas y el CC muestra un patrón muy diferente con respecto a los demás clones. El clon D2 muestra un patrón diferente con la presencia de una banda de 1113,7 pb, y la ausencia de la banda de 1883 pb. El clon D11 muestra otro patrón diferente pero que es similar al que se observó en el clon D2 y tiene la ausencia de la banda de 1883 pb.

Con el OPB 05 los clones D11 y CV presentaron el mismo patrón de bandas, los clones D7 y D8 presentan un patrón diferente con ausencias de las bandas de 430 y 340 pb. El CC siguió presentando un patrón totalmente diferente a los demás clones (Figura 18). Con el iniciador OPB 07 los clones D7 y D8 presentan el mismo patrón de bandas, los clones D2 y CV presentan otro patrón pero con la ausencia de la banda de 2027 pb y el clon D11 presenta otro patrón muy similar a los clones D2 y CV pero muestra una banda adicional de 2750 pb. El CC por otra parte muestra un patrón diferente con respecto a los demás clones (Figura 19).

Es importante destacar que los iniciadores OPA 02 y OPA 07, permiten diferenciar a todos los clones de ñame analizados (figuras 13 y 15) por lo que son candidatos a ser iniciadores para la identificación de todas las variedades de ñame existentes en el país. Asemota y col. (1996) reportaron que los iniciadores más informativos en la caracterización molecular de once cultivares de ñames jamaiquinos fueron el OPC 16 y OPG 11, en donde ambos son capaces de distinguir entre todos los cultivares, estos iniciadores presentan secuencias nucleotídicas diferentes a los iniciadores que se seleccionaron en la presente

investigación (OPA 02 y OPA 07) y que permitieron diferenciar los seis clones de ñame estudiados. Recientemente Purnomo y col. (2016) demostraron que los iniciadores OPA 01, OPD 03, OPG 02 OPG 06 y OPG 08 permiten diferenciar entre cultivares de *D. alata*, debido a que en todos los perfiles que obtuvieron mostraron diferencias en los fragmentos amplificados.

El CC mostró diferencias en el perfil de bandas con respecto a los demás clones de ñame con todos los iniciadores empleados en este estudio. Esto puede indicar que este clon está poco relacionado genéticamente con los clones venezolanos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Moreno (2016) en donde caracterizo 6 clones de ñame entre ellos el CC mediante marcadores AFLP y obtuvo que este clon mostró diferencias en todos los patrones de bandas con cada uno de los iniciadores empleados.

Los iniciadores OPA 08, OPA 09 y OPA 11, permiten agrupar a los clones D2, D8 y D11 debido a que comparten muchas características. Los iniciadores, OPA 08, OPA 09 OPA 13, OPB 05 Y OPB07 permiten clasificar a los clones D7 Y D8 en el mismo grupo, pues comparten también muchas características entre ellos.

Por otra parte, los iniciadores OPA 01 y OPA 3 muestran que los clones D2 y CV se encuentran cercanamente relacionados, esto se debe a que presentan patrones de bandas iguales, por lo que se pudieran clasificarse en el mismo grupo. Con los iniciadores OPA 08, OPA 09 y OPA 11 los clones D2 y CV también muestran relaciones entre ellos, pero a su vez están relacionados con el clon D11 debido a que comparten el mismo patrón de bandas por lo que se puede decir que estarían dentro del mismo grupo. También los iniciadores OPA 01 y OPA 3 mostraron que el clon D11 tiene patrones de bandas iguales a los de los clones D7 y D8 por lo que podría decirse que también existen relaciones con estos clones.

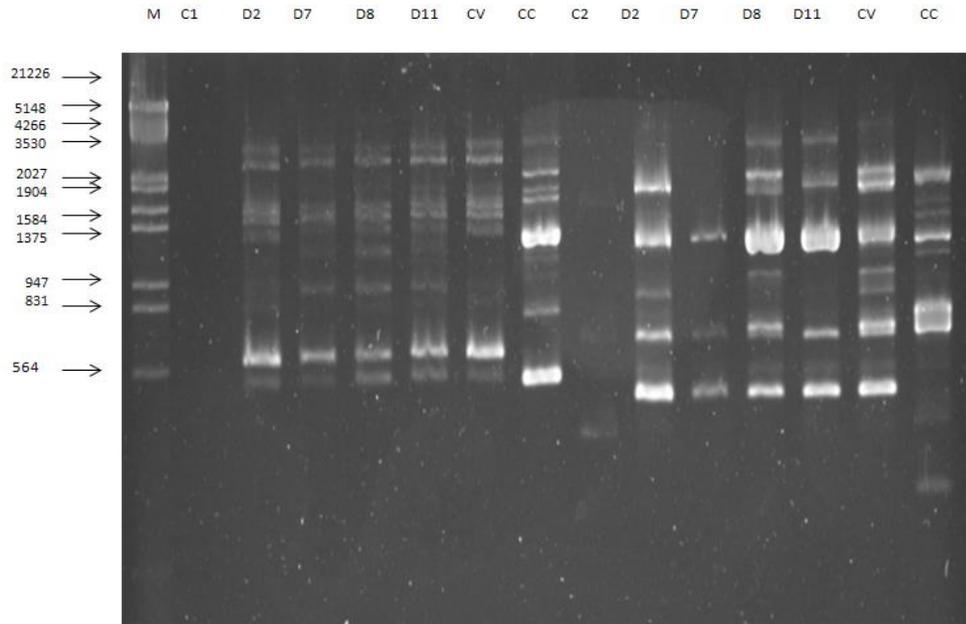


Figura 13. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de amplificación RAPD con 2 iniciadores (OPA01 Y OPA02), (D2, D7, D8, D11, CC, CV, ADN de los seis clones de ñame; C1, C2: Controles negativos), M: marcador de talla molecular Lambda DNA/EcoRI+ HindIII.

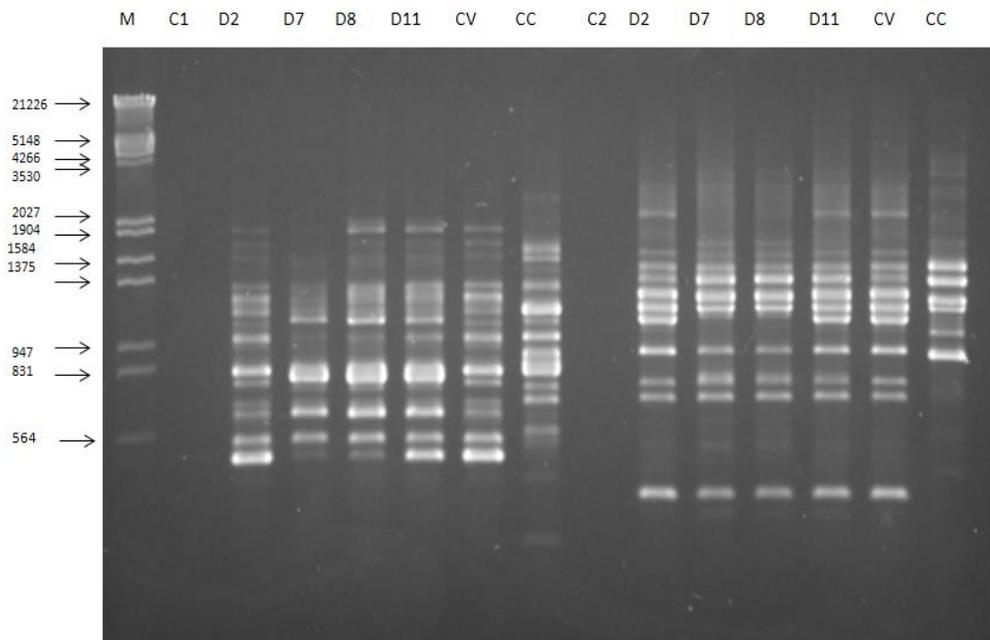
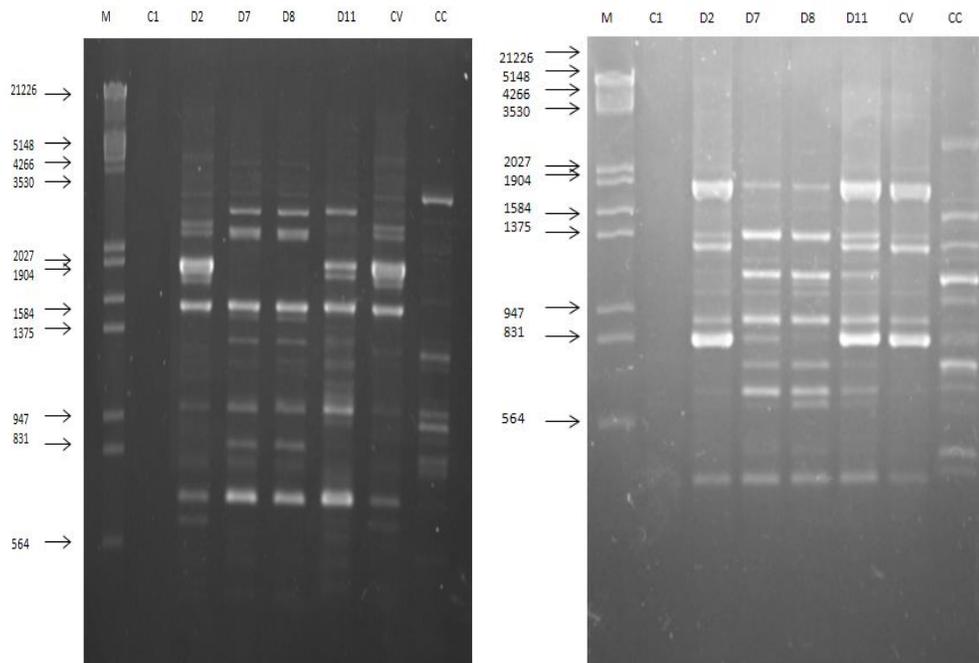


Figura 14. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % de los productos de amplificación RAPD con 2 iniciadores (OPA03 Y OPA04), ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D11, CC, CV; C1, C2: Controles negativos), M: marcador de talla molecular Lambda DNA/EcoRI+ HindIII.



Figuras 15 y 16. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de amplificación RAPD con los iniciadores OPA07 y OPA09 respectivamente, ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D11, CC, CV; C1: Control negativo), M: marcador de talla molecular Lambda DNA/EcoRI+ HindIII.

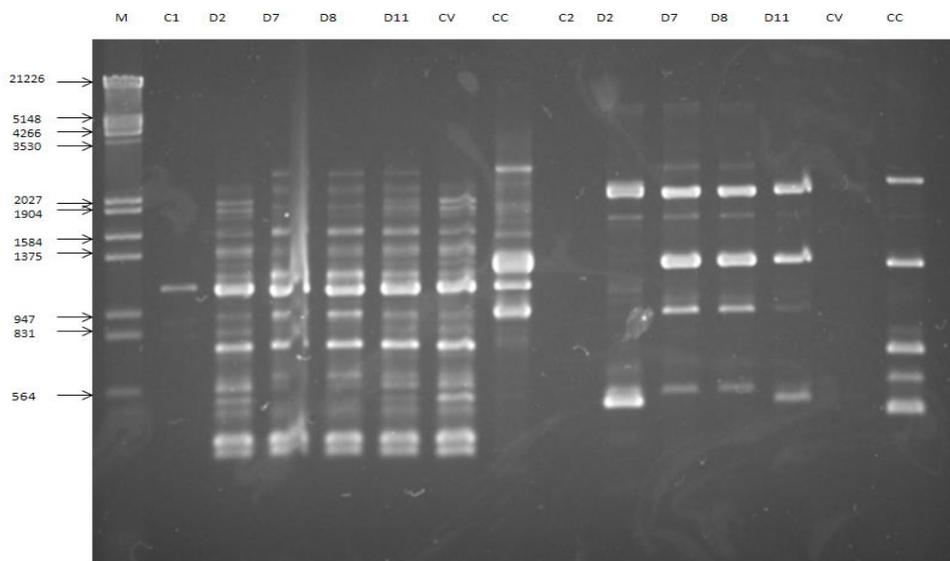


Figura 17. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de amplificación RAPD en gel de agarosa con 2 iniciadores (OPA13 Y OPA14), ADN de seis clones

de ñame (D2, D7, D8, D11, CC, CV; C1, C2: Controles negativos), M: marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI+ HindIII.

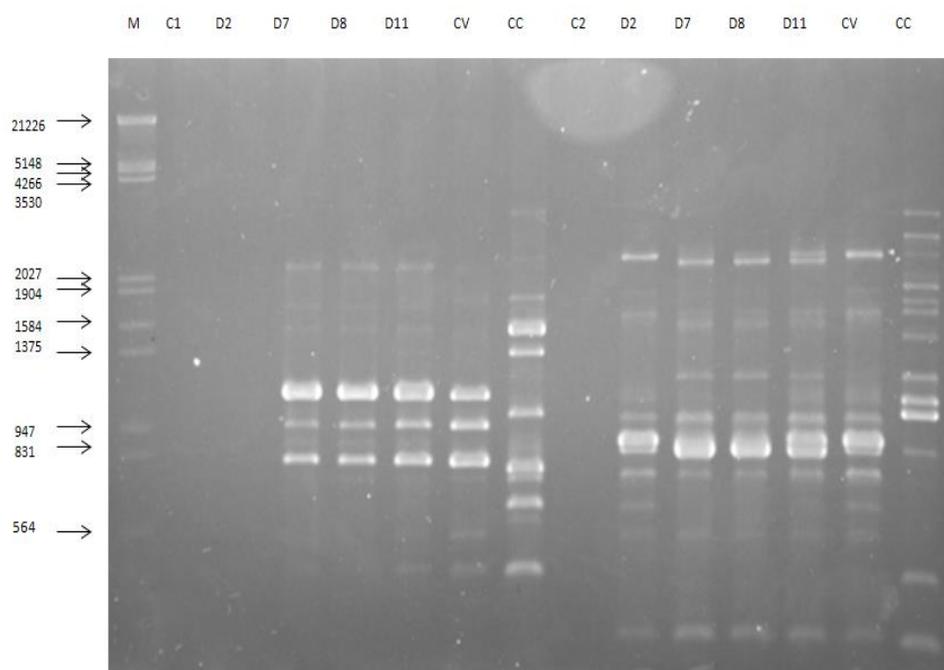


Figura 18. Registro fotográfico de electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los productos de amplificación RAPD con 2 iniciadores (OPB05 Y OPB07), ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D11, CC, CV; C1, C2: Controles negativos), M: marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI+ HindIII.

Las ambigüedades existentes acerca de la identificación de las variedades de ñame, puede causar serios problemas en el cultivo de este tubérculo. Los marcadores moleculares ofrecen una alternativa y/o complemento a los marcadores morfológicos; sin embargo, existen varios pre-requisitos para el uso eficiente de estos marcadores en la identificación de variedades y especies: (1) La variabilidad debe ser máxima entre y mínima dentro de las variedades, (2) los marcadores deben ser estables en el tiempo y (3) los marcadores deben ser independientes de los factores ambientales (Asemota y col., 1996).

El análisis RAPD sobrelleva estas dificultades y ha sido usado en la identificación de variedades en un amplio rango de especies vegetales tales como: *Solanum tuberosum* (Hoque y col. (2013), Almeida y col. (2010), y Chakrabarti y col. 2006), *Manihot esculenta* Crantz (Zambrano y col. 2003) *Sesamum indicum* L. (Dar y col. 2017), *Opuntia* spp.

Cactaceae (Mondragón 2002), *Vanilla planifolia* Andrews (Minoos y col. 2006), *Costus pictus* (Naik y col. (2017)), *Curcuma* sp. (Syamkumar y Sasikumar 2007). *Hordeum vulgare* (Mezaros y col. 2007), *Ficus carica* L. (Cabrita y col. 2001) *Lansium domesticum* Corr. (Beng y col. 2000). Según Gantait y col. (2014), también se han empleado en especies con propiedades medicinales como: *Pueraria montana* (Heider y col., 2007), *Atalantia* sp. (Ranade col., 2009), *Chlorophytum borivillianum* (Samantaray y Maiti., 2010), *Swertia chirata* (Balaraju y col., 2011), *Withania somnifera* (L.) Dunal (Rana y col., 2012). *Bacopa monnieri* (Ramesh col. 2011).

En el presente estudio se demostró que el análisis RAPD permitió la identificación de 6 clones de ñame de Venezuela. Se obtuvo una concentración de ADN adecuada que permitió la amplificación con cada uno de los 10 iniciadores empleados y se obtuvieron las huellas dactilares de cada uno de los seis clones. Los iniciadores OPA02 y OPA07 aportaron la mayor información para diferenciar a todos los clones. Los iniciadores OPA 08, OPA 09, OPA 13, OPB 05 y OPB07 permiten ubicar a los clones en tres grupos, donde los clones D2, D11 y CV pertenecen a un grupo, los clones D7 y D8 están en otro grupo y el CC se ubica en otro grupo más lejano a los dos grupos anteriores. El clon colombiano (CC) mostró ser muy diferente a los demás clones estudiados, a nivel molecular, debido a que presentó patrones totalmente diferentes en el perfil de bandas amplificadas con todos los iniciadores, con respecto a los demás clones.

Lay y col. (2001) realizaron una identificación genética de ñame (*Dioscorea* spp.) mediante análisis RAPD, donde cuatro de los dieciocho iniciadores usados, incluidos OPP 04, OPP 15, OPAP 04 y OPAP 10, produjeron huellas dactilares distintas y polimórficas y permitieron que dieciocho especies de *Dioscorea* se clasificaran en cinco subgrupos.

Asemota y col. (1996), obtuvieron perfiles RAPD altamente reproducibles y estables y un gran número de polimorfismos que permitió discriminar de manera confiable entre todos los cultivares de ñame de Jamaica, en donde los iniciadores más informativos fueron OPC-16 y OPG-11, ambos capaces de distinguir entre todos los cultivares. En el mismo sentido, Ramser y col. (1996), obtuvieron huellas dactilares polimórficas altamente reproducibles en *Dioscorea bulbifera* usando marcadores RAPD; utilizando los iniciadores G 15, C 12 y C 16 obtuvieron distintos patrones de bandas para las 22 accesiones de ñame.

Zannou y col. (2009), estudiaron la diversidad genética de aproximadamente 70 cultivares de *Dioscorea cayenensis* y *Dioscorea rotundata* (ñame de Guinea) y aproximadamente 20 cultivares de *Dioscorea alata* (ñame de agua), los analizaron usando marcadores RAPD, y obtuvieron bandas amplificadas que revelaron un alto polimorfismo al igual que en la presente investigación; sin embargo, ninguno de los iniciadores que emplearon (OPW 16, OPW 5, OPW 8 y OPQ 4 OPW 2 y OPW 6), considerado individualmente, fue capaz de distinguir todas las accesiones.

Purnomo y col. (2016), analizaron treinta y dos cultivares de ñames indonesios para determinar la variabilidad genética mediante marcadores RAPD y al igual que en esta investigación, encontraron diferencias entre los perfiles de los cultivares estudiados. También, Agbidinoukoun y col. (2017), evaluaron la diversidad genética de cinco accesiones de ñame, mediante la técnica RAPD, en donde al igual que en la presente investigación reportaron que los perfiles revelaron la presencia de diferentes bandas de ADN que variaban para las seis accesiones.

Ukpabi (2014) reportaron perfiles electroforéticos de RAPD del ADN genómico de cuatro accesiones de *D. dumetorum* amplificado con 12 iniciadores, de los cuales sólo dos pertenecen a la serie OPA (OPA 04 y OPA 12), donde el OPA 04 mostró el mismo patrón de bandas para 4 accesiones. El OPA 04 también fue empleado en la presente investigación y a diferencia de lo reportado por estos autores se obtuvo que no todos los patrones de bandas amplificados resultaron ser iguales, pudiéndose diferenciar unos clones de otros. Carvalho y col. (2000), también utilizaron el iniciador OPA04 en su ensayo RAPD para las muestras de ADN de yuca en Brasil.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, demuestran una vez más que la técnica de RAPD es muy sencilla pero poderosa para los análisis taxonómicos debido a que generaron perfiles de bandas claras, definidas, estables y totalmente reproducibles. Es importante destacar que si en la técnica se toman los controles necesarios en el procedimiento, se obtienen resultados confiables. Atienzar y col., (2009), demostraron que después de una optimización adecuada, el RAPD es un ensayo confiable, sensible y reproducible, y tiene el potencial de detectar una amplia gama de errores en el ADN (por ejemplo, aductos de ADN, rotura de ADN) así como mutaciones (mutaciones puntuales y

grandes reordenamientos). También observaron que el análisis adicional de las bandas relevantes generadas a través de perfiles RAPD permite no sólo identificar algunos de los eventos moleculares implicados en la inestabilidad genómica, sino también descubrir genes que desempeñan papeles claves, particularmente en el inicio y desarrollo de la malignidad (su trabajo fue en células cancerosas). Por esta razón, recomienda utilizar el ensayo RAPD como método de detección y prevé que estos ensayos (es decir, RAPD y técnicas relacionadas), que reflejan los efectos a nivel del genoma completo, continuarían complementando el uso de tecnologías emergentes.

La huella dactilar obtenida con los iniciadores OPA 02 y OPA07 para cada clon estudiado, se resumen en las “Cartillas de Presentación” que se muestran en este Trabajo Especial de Grado y que constituyen el aporte más importante de esta investigación, ya que consisten el documento de identificación de cada clon y que evitarán confusiones y repeticiones en la caracterización de la biodiversidad del ñame venezolano.

5.6.3) Análisis integral de los resultados obtenidos

A continuación se muestran las “Cartillas de Presentación” en estas cartillas se detallan los descriptores morfológicos más discriminativos, las fotos de las plantas establecidas *ex vitro* e *in vitro*, y la huella dactilar de cada uno de los clones establecidos en el banco de germoplasma de ñame *in vitro* y *ex vitro* del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.

Marcadores Morfológicos	CLOND2	
	Tallo	Hoja
Ausencia/presencia de cera en el tallo	Ausente	
Ausencia/presencia de alas en el tallo	Presente	
Color de las alas del tallo	Morados	
Forma de la hoja		Sagitiforme ancha
Color de la nervadura de la hoja (haz)		Verde
Color de la nervadura de la hoja (envés)		Verde
Color del peciolo de la hoja		Todo verde, morado en ambas puntas
Color del ala del peciolo de la hoja		Verde con bordes morados

Dioscorea sp. (Ñame) Clon D2

Plantas *ex vitro*Plantas *in vitro*

Detalles del color del peciolo de la hoja



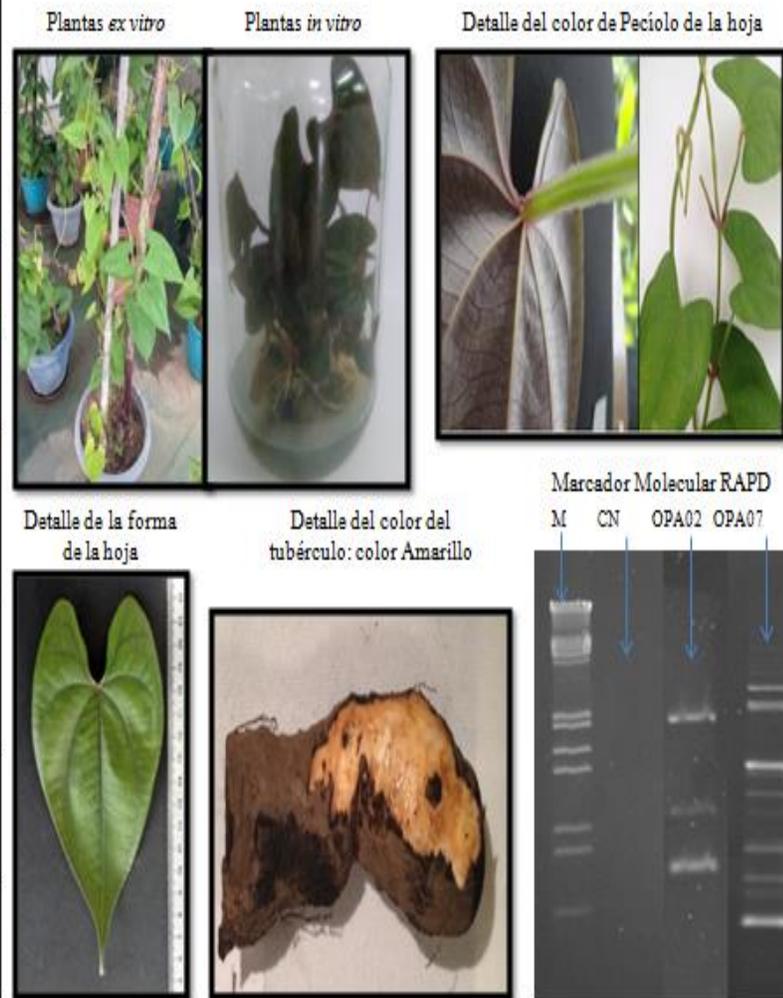
Detalles del color de las alas del Tallo

Detalle del tubérculo: Color Morado

Marcador Molecular RAPD
M CN OPA02 OPA07

Marcadores Morfológicos	CLOND7	
	Tallo	Hoja
Ausencia/presencia de cera en el tallo	Presente	
Ausencia/presencia de alas en el tallo	Presente	
Color de las alas del tallo	Morados	
Forma de la hoja		Sagitiformentrancha
Color de la nervadura de la hoja (haz)		Verde
Color de la nervadura de la hoja (envés)		Morada
Color del peciolo de la hoja		Morado
Color del ala del peciolo de la hoja		Morado

Dioscorea sp. (Ñame) Clon D7



Marcadores Morfológicos	CLONDS	
	Tallo	Hoja
Ausencia/presencia de cera en el tallo	Ausente	
Ausencia/presencia de alas en el tallo	Presente	
Color de las alas del tallo	Verdes con bordes Morados	
Forma de la hoja		Cordiforme
Color de la nervadura de la hoja (haz)		Verde
Color de la nervadura de la hoja (envés)		Verde
Color del peciolo de la hoja		Verde
Color del ala del peciolo de la hoja		Verde

Dioscorea sp. (Ñame) Clon D8

Plantas *ex vivo*Plantas *in vitro*

Detalle del color del Peciolo de la hoja



Marcador Molecular RAPD

Detalle de la forma de la hoja

Detalle del Tubérculo: Blanco Amarillento

M CN OPA02 OPA07



Marcadores Morfológicos	CLOND11	
	Tallo	Hoja
Ausencia/presencia de cera en el tallo	ausente	
Ausencia/presencia de alas en el tallo	Presente	
Color de las alas del tallo	Verde	
Forma de la hoja		sagitiforme
Color de la nervadura de la hoja (haz)		Verde
Color de la nervadura de la hoja madura (envés)		Verde
Color del peciolo de la hoja		Verde
Color del ala del peciolo de la hoja		Blanco

Dioscorea sp. (Ñame) Clon D11

Plantas *ex vitro*Plantas *in vitro*

Detalle del color del Peciolo



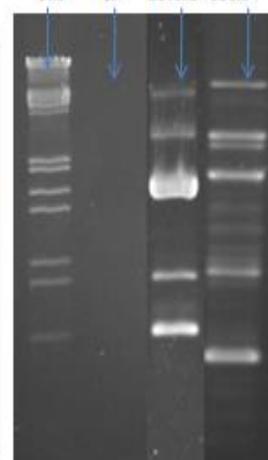
Detalle de la forma de la hoja



Detalle del color del Tubérculo: Blanco



Marcador Molecular RAPD



Marcadores Morfológicos	CLON CV	
	Tallo	Hoja
Ausencia/presencia de cera en el tallo	Presente	
Ausencia/presencia de alas en el tallo	Presente	
Color de las alas del tallo	verde	
Forma de la hoja		Sagitiforme Larga
Color de la nervadura de la hoja (haz)		amarillenta
Color de la nervadura de la hoja (envés)		Amarillenta
Color del peciolo de la hoja joven		verde
Color del ala del peciolo de la hoja		Verde

Dioscorea sp. (Ñame) Clon CV

Plantas *ex vitro*Plantas *in vitro*

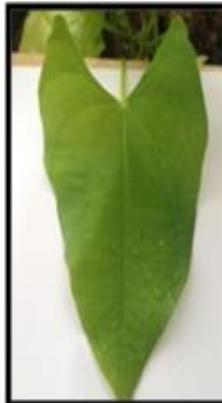
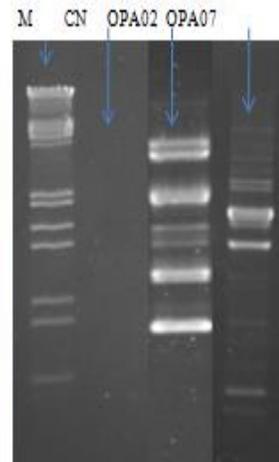
Detalle del color del peciolo



Detalle de la forma de la hoja

Detalle del color del
Tubérculo: Blanco
Amarillento

Marcador Molecular RAPD



Dioscorea sp. (Ñame) Clon CC

Marcadores Morfológicos	CLON CV	
	Tallo	Hoja
Ausencia/presencia de cera en el tallo	Ausente	
Ausencia/presencia de alas en el tallo	Presente	
Color de las alas del tallo	verde	
Forma de la hoja		Sagitiforme Larga
Color de la nervadura de la hoja (haz)		Verde
Color de la nervadura de la hoja (envés)		Verde
Color del peciolo de la hoja joven		verde
Color del ala del peciolo de la hoja		Verde

Plantas *ex vitro*Plantas *in vitro*

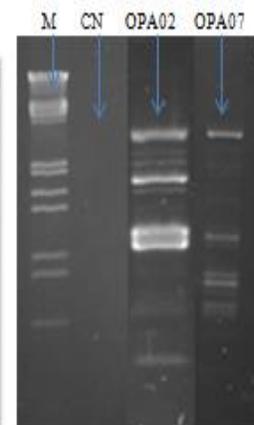
Detalle del color del Peciolo



Detalle de la forma de la hoja

Detalle del color de Tubérculo: Amarillo

Marcador Molecular RAPD



6) CONCLUSIONES

1) La micropropagación resultó ser el mejor método para la regeneración *in vitro* de los 6 clones de ñame. Con este método se obtuvo más del 70% de los segmentos nodales sanos y libres de agentes contaminantes. Se obtuvo un promedio entre 5 y 7 brotes por explante con el medio MS+BA (0,5); mientras que en el medio con 1/5 de las sales MS se favoreció la producción de raíces en cada uno de los seis clones de ñame, especialmente en el clon D11 donde se obtuvieron el mayor número de raíces por explantes (7,0). Para el mantenimiento de los clones de ñame en el Banco de Germoplasma *in vitro*, se recomienda el uso del medio de cultivo compuesto por 1/5 de las sales MS.

2) Los descriptores de ñame empleados mostraron que muchos clones comparten características comunes entre si, en donde el clon D11 comparte un mayor número de características morfológicas con los clones D7, D8, CV y CC. La caracterización molecular RAPD arrojó un resultado de 717 fragmentos amplificados, con un tamaño comprendido entre 92,2 a 5333,5 pb. Los 10 iniciadores empleados amplificaron 629 bandas monomórficas y 88 polimórficas entre los clones estudiados, lo que evidenció un alto porcentaje de polimorfismo (8,8%). Los iniciadores OPA 02 y OPA 07, permiten diferenciar a todos los clones de ñame analizados, por lo que su uso se puede recomendar para la identificación de todas las variedades de ñame existentes en el país.

3) Los descriptores morfológicos y la huella dactilar obtenida con los iniciadores OPA02 y OPA07 para cada clon permitieron la elaboración de cartillas de identificación lo que constituye el aporte más importante de esta investigación, ya que consisten en la “carta de presentación” de cada uno de los seis clones y que evitarán confusiones y repeticiones en la caracterización de la biodiversidad del ñame venezolano.

4) Las herramientas biotecnológicas empleadas en la presente investigación permiten producir semillas sanas y libres de patógenos en corto tiempo y en espacio reducidos, y que puede emplearse para impulsar la producción y consumo de tan prometedor rubro, de esta forma se puede promover la inclusión

de estos materiales en programas de mejoramiento, con el propósito de obtener el mayor beneficio de las potencialidades de tan importante cultivo.

7) FACTIBILIDAD

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, del Instituto de Biología Experimental, de la Universidad Central de Venezuela, donde se contó con las instalaciones, reactivos y equipos para realizarlo, y gracias al financiamiento otorgado por la Corporación para el Desarrollo Científico y Tecnológico (CODECYT) a través del proyecto: “Recuperación, Mantenimiento y resguardo de Banco de Germoplasma de Clones de Ñame (*Dioscorea* sp.)

8) BIBLIOGRAFÍA

Agbidinokoun A., Missihoun A. A., Akonde P., Sagbadja H. A., Agbangla C, Ahanhanzo C. 2017. Assessment for the incidence of number of subcultures on genotype stability for in vitro plantlets of yam (*Dioscorea* spp.) using RAPD markers. International Journal of Current Research in Biosciences and Plant Biology 4(4): 32-38.

Aguilar Z. 2012. Caracterización morfológica y molecular de la colección de *Dioscorea* spp. Banco de germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica. Tesis de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. pp. 26.

Ahuja S., Mandal B. B., Dixit S., Srivastava P. S. 2002. Molecular, phenotypic and biosynthetic stability in *Dioscorea floribunda* plants derived from cryopreserved shoot tips. Plant Science. 163: 71 -977.

Albarrán J. G., Fuenmayor F., Fuchs, M., Martínez G., Rodríguez A., Manzanilla E., Torrealba M. 2011. Estrategias biotecnológicas para la conservación de germoplasma en el INIA-CENIAP Venezuela. Caso yuca y musáceas. Agronomía Tropical, 61: 85-94.

Almeida R. E., Vilela P. L, De Carvalho. H. H, Texeira. G. C. 2010. Molecular characterization and genetic diversity of molecular characterization and genetic diversity of potato cultivars using SSR and RAPD markers. Brazilian Society of Plant Breeding. 10: 204-210.

Alva S. 2014. Evaluación de la resistencia a *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary mediante el uso de marcadores AFLP en plantas de *Solanum tuberosum* (L.) cultivadas *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. 89-119 pp.

Anike F. N., Konan K., Olivier K., Dodo H. 2012. Efficient shoot organogenesis in petioles of yam (*Dioscorea* sp.). Plant Cell Tissue Organ Culture. 111: 303–313.

Asemota H. N., Ramser J., Lopez P. C., Weising K., Kahl G. 1996. Genetic variation and cultivar identification of Jamaican yam germplasm by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. Euphytica 92: 341-351.

Asha K., Nair, G. 2007. *In vitro* bulbil induction in *Dioscorea* species. Journal of Root Crop. 33(2): 81-87.

Ashmore S. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. 67 pp.

Atienzar F. A., Jha Awadhesh N. 2006. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. Mutation Research. 613: 76–102.

Azofeifa D. A. 2006. Revisión bibliográfica marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana. 17 221-242.

Azofeifa D. A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía mesoamericana 20 (1): 153-175.

Balaraju K., Saravanan S., Agastian P., Ignacimuthu S. 2011. A rapid system for micropropagation of *Swertia chirata* Buch Ham. ex Wall.: an endangered medicinal herb via direct somatic embryogenesis. Acta Physiologiae Plantarum 33:1123–1133.

Becerra V., Paredes C. M. 2006. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica. 60: 270-281.

Beng K. S., Mahani M. C., Ratnam W. Mohd N. N. 2000. Genetic Relatedness among *Lansium domesticum* Accessions Using RAPD Markers. Annals of Botany. 86: 299 -307.

Behera K. K., Sahoo S., Prusti A. 2009. Regeneration of plantlet of water yam (*Dioscorea oppositifolia* L.) through *in vitro* culture from nodal segments. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 37: 94-102.

Behera K. K., Sahoo, S., Prusti, A. 2010. Micropropagation of greater yam (*Dioscorea alata* L.cv Hatikhujia) through vine nodes. Journal of Root Crops. 36: 27-32.

Belarmini M., del Rosario A. G. 1991. Callus induction and organogenesis in *Dioscorea* species. Japanese Journal of Breeding. 41: 561-569.

Beng K. S., Mahani M. C., Ratnam W. Mohd N. N. 2000. Genetic relatedness among *Lansium domesticum* accessions using RAPD markers. Annals of Botany. 86: 299 - 307.

Bonilla M., Hernández, O. 2012. Propagación *in vitro* de ñame (*Dioscorea* sp.): una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma. Agronomía. 20: 65-76.

Borges G. M., González P. G., Reyes A. D. M., Rodríguez G. M., Villavicencio R. A., y Estrada A. E. 2017. Respuesta de plantas *in vitro* de ñame clon 'blanco de guinea' al uso del pectimorf. INCA.Universidad de Granma, Cuba. 38: 129-136.

Borges M., Aguilera N., Saborí G., Vázquez, J. 1999. Influencia de distintos antioxidantes en la micropropagación del ñame (*Dioscorea alata* L.). Centro Agrícola. 26 (2): 69-71.

Borges M., Alarcón Y., Malaurie B., Hernández Y., Silva, J. 2009a. Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (*Dioscoreaceae*). Revista Peruana de Biología. 16: 203-208.

Borges M., Estrada E., Pérez I. Meneses S. 2009b. Uso de diferentes tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon Caraqueño. Revista Colombiana de Biotecnología. 11(2): 127-135.

Borges, M., Sosa, Y. 2007. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de carbón activado sobre la multiplicación *in vitro* de ñame. Biotecnología Vegetal. 8 (2): 87-90.

Bustamante S., Guzmán M., Buitrago G. 2003. Caracterización molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando DNA Amplificaron Fingerprinting (DAF) en condiciones radiactivas. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 5: 57-63.

Cabrita A. L. F., Aksoyb U., Hepaksoyb S., Leitaäoa J. M. 2001. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among (*Ficus carica* L.) clones. *Scientia Horticulturae* .87:261-273.

Cabrita, R. 2014. Optimización de un sistema de regeneración *in vitro* para el clon criollo colombiano de ñame (*Dioscorea* sp.). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela. 216 pp.

Calva C. G., Pérez V. J. 2005. Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de Alimentos para el Futuro. 6: 1067-1079.

Cardozo V. 2005. Tissue culture: the manipulation of plant development. Chapter Book Plant biotechnology and genetics. Principles, techniques and applications ed. Stewart, C.N. pp 29.

Carvalho L. J. C. B., Schaal B. A., Fukuda W. M. A. 2000. Genetic diversity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in germplasm collection assessed by RAPD assay. *Biotechnology*. 80-92 pp.

Chakrabarti S. K., Pattanayak D., Sarkar D., Chimote V.P., Naik P. S. 2006. Stability of RAPD fingerprints in potato: effect of source tissue and primers. *Biología Plantarum*. 50(4): 531-536.

Chen F., Fu Y., Wang D., Gao X., Wang L. 2007. The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation and microtuberization of *Dioscorea nipponica* Makino. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26: 38-45.

Chen Y., Fan J., Yi F., Luo Z., Fu Y. 2003. Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis* Plant cell tissue and organ culture 73: 75–80.

Cheng K. T., Liu S. Y. 1996. Genetic relationships in *Dioscorea alata* L. revealed by RAPD analysis. Chinese Pharmaceutical Journal. 48(3): 197-205.

Coursey D.G. 1976. Yams *Dioscorea* spp. (*Dioscoraceae*). In: Evolution of Crop Plants. N.W. Simmonds (Ed.). London and New York: Longmans, pp. 70-74.

Dansi A., Mignouna H.D., Zoundjehkpon J., Sangare A., Ahoussou N., Asiedu R. 2000. Identification of some Benin Republic's Guinea yam (*Dioscorea cayenensis/Dioscorea rotundata* complex) cultivars using Randomly Amplified Polymorphic DNA. Genetic Resources and Crop Evolution.47: 619–625.

Dar A. A., Mudigunda S., Mittal P. K., N Arumugam. 2017. Comparative assessment of genetic diversity in *Sesamum indicum* L. using RAPD and SSR markers. Biotech. 7:10-17.

Das, S., Dutta, M., Mazumder, P. 2013. *In vitro* propagation of genus *Dioscorea*-A critical review. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research. 6: 26-30.

De la Cruz, G., Borges M., Aguilera N., Saborit G. Labrada M. 1998. Multiplicación acelerada del ñame (*Dioscorea alata* L.) en condiciones *in vitro*. Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana, Cuba. Pp: 8.

Demeke T., Lynch, D. R., Kawchuk L.M., Kozub G. C., Armstrong J.D. 1996. Genetic diversity of potato determined by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. Plant Cell Reports. 15: 662-171.

Díaz N. L. C., Carmona W. O. E., Beltran H. J. D. 2015. Optimización de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea* spp. por crecimiento mínimo. Revista Colombiana. Biotecnológica. 17: 32-39.

Doyle J. J., Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Phytochemical Bulletin. 19:11-15.

Dumet D., Ogunsola, D. 2008. Guías para la regeneración de germoplasma: ñame. En: Dullo, M., Thormann I., Jorge, M., Hanson, J., editors. Crop specific regeneration guidelines. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 8 pp.

Ezeibekwe I., Ezenwaka C., Mbagwu F., Unamba C. 2009. Effects of combination of different levels of Auxin (NAA) and Cytokinin (BAP) on *in vitro* propagation of *Dioscorea rotundata* L. (White Yam). Journal of Molecular Genetics. 1: 18-22.

FAO. 2014. Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Edición revisada. Roma. 3-5 pp.

Gantait S., Debnath S., Ali N. 2014. Genomic profile of the plants with pharmaceutical value. Biotechnology. 4: 563–578.

George E., Hall M., Jan K. G. 2008. Plant propagation by tissue culture. Third Edition. Springer. 65-113 pp.

González M. 2012. El ñame (*Dioscorea* sp.): Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. Cultivos Tropicales. 33: 5-15.

González Y. 2003. Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE. Costa Rica. Tesis de *Magister Scientiae*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Pp:93.

Heider B., Fischer E., Berndt T., Schultze K. R. 2007. Analysis of genetic variation among accessions of *Pueraria montana* (Lour.) Merr. var. *lobata* and *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth. based on RAPD markers. Gen Resources and Crop Evolution. 54:529–542.

Hoque M. E., Huq H. Moon N.J. 2013. Molecular diversity analysis in potato (*solanum tuberosum* L.) through RAPD markers. SAARC J. Agri. 11: 95-102.

IPGRI/IITA. 1997. Descriptores para el ñame (*Dioscorea* spp.). Instituto Internacional de Agricultura Tropical, Ibadán, Nigeria Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. 64 Pp.

Jiménez D., Hernández R. 2009. Manual técnico del cultivo de ñame. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Ciudad de Panamá. 44 Pp.

Kadota M., Niimi Y. 2004. Improvement of micropropagation of japanese yam using liquid and gelled medium culture. *Scientia Horticulturae*. 102: 461-466.

Kohmura, H., Araki, H., Imoto, M. 1995. Micropropagation of 'Yamatoimo' Chinese yam (*Dioscorea opposita*) from immature leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 40: 271-276.

Lay H. L., Liu H. J., Lia M. H., Chen C. C., Liu S. Y., Sheu B. W. 2001. Genetic identification of chinese drug materials in yams (*Dioscorea spp.*) by RAPD analysis. *Journal of Food and Drug Analysis*. 9: 132-138.

Leblanc H. A, Arce P. J. 2007. Producción de raíces y tubérculos: los ñames cultivados en la región atlántica de Costa Rica. Universidad EARTH. 2-18 pp.

López J., Nieto R., Barrietos A., Rodríguez E., Colinas M., Borys M., González F. 2008. Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus spp.*). *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 4: 97-111.

López Y. 1999. Caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres de *Quassia amara* L. Ex. Blom de Centroamérica. Tesis de *Magister Scientiae*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 215 pp.

Mahesh R., Muthuchelian K., Maridass M., Raju G. 2010. In vitro propagation of wild yam, *Dioscorea wightii* through nodal cultures. *International Journal of Biological Technology*. 1:111-11

Malajovich M. A. 2006. Biotecnología. 2da Edición, Editorial Universidad Nacional de Quilmes. 121-132 pp.

Malurie B., Pungu O., Dumont R., Trouslot M. 1993. The creation of an *in vitro* germplasm collection of yam (*Dioscorea spp.*) for genetic resources preservation. *Euphytica*. 65: 113-122.

Marín E., Vargas T. E., Oropeza M. 2012. Variabilidad genética y anatomía foliar comparada de plantas de *Dioscorea alata* mantenidas en cultivo *in vitro*. *Interciencia*. 37: 447-483.

Medero V., Del Sol L., García M., López J., Ventura J. C., Rodríguez S. 1999. Metodología para la micropropagación del ñame (*Dioscorea alata* L.). Resúmenes BIOCAT-99, Granma, Cuba. 12 pp.

Meszáros K., Karsai I., Kuti C., Banyai J., LANG L., Bedo Z. 2007. Efficiency of different marker systems for genotype fingerprinting and for genetic diversity studies in barley (*Hordeum vulgare* L.). *South African Journal of Botany* 73: 43–48.

Mino D., Nirmal B.K., Ravindran P.N., Peter K.V. 2006. Interspecific hybridization in vanilla and molecular characterization of hybrids and selfed progenies using RAPD and AFLP markers. *Scientia Horticulturae*. 108: 414–422.

Mondragón C. J. 2002. Caracterización molecular mediante RAPDs de una colección de nopal de (*Opuntia* spp., cactaceae) del centro de México, como base del mejoramiento genético. *Chipango serie Horticultura*. 9: 97-114.

Montaldo A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 408 pp.

Monteiro D.A., Peressin V.A. 2002. Culture do inhame in: Cereda, M. P. (Ed). *Agricultura: Tuberosa Amilácea Latino Americana*. Sao Paulo: Fundacao cargil. 511-522 pp.

Moreno M. 2016. Caracterización morfológica y nutricional de seis materiales de ñame (*Dioscorea* spp.) y su establecimiento *in vitro*. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. 320 pp.

Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*. 15: 475-597.

Mwirigi P., Kahangi E., Nyende, A. Mamati, E. 2010. In vitro propagation of the Kenyan yam (*Dioscorea* spp.). Africa Journal Horticulture Science. 3:112-122.

Naik A., Prajapat P., Krishnamurthy R., Pathak J. M. 2017. Assessment of genetic diversity in *Costus pictus* accessions based on RAPD and ISSR markers. Biotech. 7: 70

Oropeza M., Marín E., Royero M., Vargas, T. E. 2006. Establecimiento de un protocolo RAPDs eficiente para plantas de ñame. Agronomía Tropical. 56: 601-606.

Peixoto P.A., Caetano L.C., Lopes J. 2000. Inhame: o nordeste fértil. Maceió: Edufal. INCAPER. 88 pp.

Perea D., Buitrago H. 2000. Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo del ñame. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Colombia. 17-32 pp.

Perea M., Buitrago G., Tirado A., Humanez A. 2001. Contribución de la Biotecnología al desarrollo sostenible del cultivo del ñame. Biotecnología Agrícola. Un enfoque hacia el mejoramiento de plantas. Asociación Colombiana de Estudios Vegetales in vitro. Editorial Guadalupe Ltd. Bogotá -Colombia, pp: 291-301.

Phillips M. W. 1998. Biología molecular y marcadores moleculares en la agricultura. Memoria II Congreso Nacional de Estudiantes del sector Agropecuario Costarricense. IICA-EARTH-CATIE. 77-87 pp.

Piña E. J. L., Contreras C. V., Gutiérrez M. M. G., Vázquez G. L. M., Arzate F. A. M. 2010. Caracterización morfológica y molecular de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonia* (L.F.) DC. Biotecnología Agrociencia. 44:147-158.

Polanco M. 2011. Caracterización morfológica y molecular de materiales de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poep. & Endl) colectados en la ecoregión eje cafetero de Colombia. Maestría en Ciencias Agrícolas. Universidad Nacional de Colombia. 92 pp.

Poornima G. N., Ravishankar R.V. 2007. In vitro propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). Afr. J. Biotechnol. 6(20): 2348-2352.

Purnomo., Daryono B. S, Rugayah, Sumardi I., Shiwachi H. 2016. Genetic variability and classification of Indonesian yams (*Dioscorea* spp.) based on RAPD. Sabrao Journal of Breeding and Genetics. 48(4): 377-390.

Quintero I., Polo J., Jama A., Espitia A. 2003. Enraizamiento *in vitro* de *Dioscorea* sp. Revista Colombiana de Biotecnología. 5(2):51-56.

Rana S., Dhar N., Bhat W. W., Razdan S., Khan S., Dhar R. S., Dutt P., Lattoo S. K. 2012. A 12-deoxywithastramonolide-rich somaclonal variant in *Withania somnifera* (L.) Dunal: molecular cytogenetic analysis and significance as a chemotypic resource. In Vitro Cell Dev Biol-Plant 48:546–554.

Ranade S. A., Nair K. N., Srivastava A. P., Pushpangadan P. 2009. Analysis of diversity amongst widely distributed and endemic *Atalantia* (family Rutaceae) species from Western Ghats of India. Physiol Mol Biol Plants. 15:211–224.

Ramesh M., Vijayakumar K., Karthikeyan A., Pandian S. 2011. RAPD based genetic stability analysis among micropropagated, synthetic seed derived and hardened plants of *Bacopa monnieri* L.: a threatened Indian medicinal herb. Acta Physiology Plant 33:163–171.

Ramos D. V. A., Bustamante R. S. L., Rincón V. J., Rojas C. M. A., Raz L., Buitrago H. G. 2015. Identificación, establecimiento *in vitro* y análisis fitoquímico preliminar de especies silvestres de ñame (*Dioscorea* spp.) empleadas con fines medicinales. Revista. Colombiana de. Biotecnología. 17: 9-17.

Ramser J., Weising K., Kahl G., López P. C., Wetzler R. 1996. Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by Random Amplified Polymorphic DNA. Genome. 39:17-25.

Reina, Y. 2012. El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Documentos de trabajo sobre economía regional. Banco de la República. Centro de Estudios Económicos Regionales (CEER). Cartagena, Colombia. 31 pp.

Reinoso G. L. 2014. Regeneración *in vitro* vía organogénesis y aislamiento de protoplastos de *Gmelina arborea* a partir de plantas *in vitro*. Trabajo Especial de Grado. Pontificia Universidad Javeirana. Facultad de Ciencias. Bogotá. 26-28 pp.

Rodríguez W. 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). Agronomía Mesoamericana. 11: 133-152.

Royero M., Vargas T.E., Oropeza M. 2007. Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata*. Interciencia. 32: 247-252.

Ruiz P. E. E. 2003. Severidad del complejo de enfermedades en el cultivo del ñame (*Dioscorea* spp.) en diferentes densidades de siembra y soportes vivos de madera negro (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp) y su rentabilidad en Azuero. Tesis de Magíster Scientiae. Panamá. 24 pp.

Salazar R. Hoyos R. A. 2007. Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín. 60 (2): 3907- 3921.

Samantaray S., Maiti S. 2010. An assessment of genetic fidelity of micropropagated plants of *Chlorophytum borivillianum* using RAPD markers. Biol-Plant 54:334–338.

Sambrook, J., Russell, D. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 1500 pp.

Sánchez M., Fernández H., Esteban C. A. 2008. Caracterización agromorfológica de cultivares de ñame (*Dioscorea* spp.) procedentes del suroccidente de Guatemala y efecto de su variabilidad como espesante de salsas caseras. Informe final. Programa universitario de investigación en alimentación y nutrición. Universidad de San Carlos de Guatemala. 90 pp.

Scott G., Rosegrant M., Ringler C. 2000. Raíces y tubérculos para el siglo 21: Tendencias, proyecciones y opciones de política. Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias. Washington, D.C. U.S.A. 71 pp.

Syamkumar S., Sasikumar B. 2007. Molecular marker based genetic diversity analysis of *Curcuma* species from India. Scientia Horticulturae. 112 :235–241.

Tariqul I., Uddin R., Afroz R., Rahman S., Haque, M. 2011. Characterization and maintenance of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. Bangladesh Journal of Agricultural Research. 36: 605-621.

Thankappan S., Abraham K. 2012. Micropropagation and microtuber induction in *Dioscorea wallichii* Hook. F. Journal of Root Crops. 38: 109-115.

Thorpe T.A. 2014. History of Plant Tissue Culture. Methods in Molecular Biology, vol. 318: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition Edited by: V. M. Loyola-Vargas and F. Vázquez Flota Humana Press Inc., Totowa, NJ. 58 pp.

Ukpabi J. U. 2014. Molecular analysis of *Dioscorae dumetorum* in South-East Nigeria using Random Amplified Polymorphic DNA markers. American Journal of Microbiology and Biotechnology. 1: 77-82.

Velasco R. A. P., Torres M. M. I., Molina M. S., Sánchez G. J. J, Santacruz R. F. 2014. Efficiency of RAPD, ISSR, AFLP and ISTR markers for the detection of polymorphisms and genetic relationships in camote de cerro (*Dioscorea* spp.). Electronic Journal of Biotechnology. 17: 65-71.

Vidal C. 2010. El ñame espinoso (*Dioscorea rotundata* Poir): Una opción para la producción de jarabes edulcorantes intermedios para la industria alimentaria. Revista de Investigación Agraria y Ambiental. 1: 19-28.

Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primer. Nucleic Acids. 18: 7213–7218.

Wen G.Q., Li J., Liu X.H., Zhang Y.S., Wen S.S. 2014. Extraction of total DNA and optimization of the RAPD reaction system in *Dioscorea opposita* Thunb. Genetics and Molecular Research 13 (1): 1339-1347.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids. 18: 6531–6535.

Williams J., Hanafey M., Rafalki A., Tingey S.V. 1993. Genetic analysis using amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology*. 218: 704-740.

Yan H., Yang L., Li Y. 2011. Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 104: 193-198.

Zambrano A. Y., Demey J. R., Fuenmayor F., Segovia V., y Gutiérrez Z. 2003. Diversidad genética de una colección de yuca a través de marcadores moleculares RAPDs. *Agronomía Tropical* 53: 157-173.

Zannou A., Agbicodo E., Zoundjihékpon J., Struik P. C., Ahanchédé A., Kossou D. K., Sanni A. 2009. Genetic variability in yam cultivars from the Guinea Sudan zone of Benin assessed by Random Amplified Polymorphic DNA. *African Journal of Biotechnology*. 8: 26-36.

Consultas on line

- FAO: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC> (caracas, 28/07/2017)
- FEDEAGRO: <http://www.fedeagro.org/> (caracas, 28/07/2017)
- USDA: <https://www.agcensus.usda.gov/Publications/2007> (Caracas, 28/97/2017).