

# VARIABILIDAD GENÉTICA Y ANATOMÍA FOLIAR COMPARADA DE PLANTAS DE *Dioscorea alata* MANTENIDAS EN CULTIVO *IN VITRO*

Erick Marín, Teresa Edith Vargas y Maira Oropeza

## RESUMEN

Se estudió la variabilidad genética y la anatomía foliar de plantas de ñame (*Dioscorea alata*) regeneradas *in vitro* por sistemas de organogénesis y micropropagación, en relación con la planta madre mantenida en condiciones de vivero. Para la determinación de la variabilidad genética de las plantas regeneradas, se usaron ocho iniciadores en un análisis RAPD y se registró la presencia o ausencia de bandas como polimorfismos. 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 espe-

cie. El estudio de la epidermis y mesófilo de las hojas de las plantas procedentes del cultivo *in vitro* en comparación con la planta madre, se realizó mediante cortes transversales a mano alzada. La anatomía foliar de las plantas cultivadas *in vitro* es significativamente diferente a la de la planta madre para las características estudiadas; mientras que no se observaron diferencias entre las plantas obtenidas por organogénesis y por micropropagación. Las diferencias anatómicas observadas no comprometen el éxito en la adaptación de estas vitroplantas a condiciones de vivero.

## Introducción

*Dioscorea alata* L. (ñame) es una de las especies más importantes del género *Dioscorea*, dado su valor económico, farmacológico y alimenticio, cultivándose en los trópicos y en las regiones subtropicales y templadas (Royero, 2004). Debido a la importancia de este género, Royero *et al.* (2007), establecieron sistemas de regeneración *in vitro* para *D. alata* vía micropropagación (plantas obtenidas a partir de la inducción del desarrollo de yemas axilares) y organogénesis (plantas obtenidas mediante la inducción de brotes neoformados a partir de segmentos de tallo).

Una de las principales consecuencias que puede tener el cultivo de tejidos vegetales, es la variación genética que presentan los tejidos al ser some-

tidos a procesos de des-diferenciación y rediferenciación durante el cultivo *in vitro*, variación ésta que Larkin y Scowcroft (1981) definieron como variación somaclonal, por lo que un requerimiento importante para que el proceso de regeneración *in vitro* sea exitoso es que las plantas regeneradas presenten uniformidad (estabilidad genética) comparadas con las plantas propagadas convencionalmente (Zhao *et al.*, 2005).

La variación somaclonal está relacionada directa o indirectamente con modificaciones del ADN, específicamente hipo e hipermetilación (Scowcroft *et al.*, 1987, Phillips *et al.*, 1990). Kaeppler y Phillips (1993) observaron que los cambios en los patrones de metilación del ADN ocurren con una frecuencia lo suficientemente alta como para

ser un factor que contribuye a la amplia gama de variaciones genéticas en las plantas regeneradas. Por su parte, Peschke y Phillips (1992) reportaron que el tipo de explante, el tipo y edad de cultivo, y el genotipo también son factores que pueden originar la variación somaclonal.

En relación a la influencia del tipo de sistema de cultivo *in vitro* empleado, cuando las plantas son regeneradas por micropropagación, la variación genética generada es mínima o nula, seguida por la embriogénesis somática y la organogénesis, que produce una mayor proporción de vitroplantas con variaciones genéticas (Yang *et al.*, 1999).

Debido a los efectos que puede tener la variación somaclonal sobre la calidad de las plantas regeneradas, se han desarrollado numerosas

técnicas para detectarla, siendo las más eficientes para este propósito aquellas que incluyen la utilización de marcadores moleculares.

El RAPD (amplificación al azar de ADN polimórfico) es una técnica de detección de polimorfismos genéticos, basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y desarrollada por Williams *et al.* (1990). Consiste en la utilización de iniciadores oligonucleótidos de diez pares de bases (pb) con secuencias arbitrarias, lo que trae como consecuencia una amplificación al azar de las secuencias del ADN genómico. Esto produce patrones de bandas polimórficas que se pueden usar como huellas genéticas (Oropeza *et al.*, 1995).

Esta técnica ha sido usada para la detección de variabilidad genética en plantas de

**PALABRAS CLAVE / Anatomía foliar / *Dioscorea alata* / Cultivo *in Vitro* / Micropropagación / Organogénesis / RAPD /**

Recibido: 08/03/2012 Modificado: 29/05/2012. Aceptado: 31/05/2012.

**Erick Marín.** Licenciado en Biología, Universidad Central de Venezuela (UCV). Estudiante del Postgrado en Botánica, UCV, Venezuela. e-mail: ealbertomarín@yahoo.es

**Teresa Edith Vargas.** Doctora en Ciencias en Botánica, UCV. Asistente de Investigación, Instituto de Biología Experimental, UCV, Venezuela.

**Maira Oropeza.** Doctora en Ciencias, UCV. Profesora-Investigadora, UCV, Venezuela. Dirección: Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, Centro de Botánica Tropical, Instituto de

Biología Experimental, Facultad de Ciencias, UCV. Apartado 47114, Caracas 1041, Venezuela. email: maira.oropeza@ciens.ucv.ve.

## GENETIC VARIABILITY AND COMPARATIVE LEAF ANATOMY OF PLANTS OF *Dioscorea alata* MAINTAINED UNDER *IN VITRO* CULTURE

Erick Marín, Teresa Edith Vargas and Maira Oropeza

### SUMMARY

Genetic variability and foliar anatomy of yam (*Dioscorea alata*) plants regenerated by *in vitro* organogenesis and micropropagation, were studied in relationship with a greenhouse mother plant. To estimate the genetic variability through RAPD analysis eight arbitrary primers were used, and the presence and absence of bands were registered as polymorphisms. The results show a 0.12% of polymorphism for both *in vitro* organogenesis and micropropagation regenerated plants, implying that both systems are efficient for mass propagation of yam.

Leaf tissue cross sections from *in vitro* and *in vivo* plants was studied to analyze the epidermis and mesophyll leaf cells. The parameters analyzed showed significant differences between *in vitro* and *in vivo* plants, but no differences were observed when comparing foliar anatomy from *in vitro* organogenesis and micropropagation derived plantlets. Foliar anatomy of *in vitro* plantlets did not compromise the acclimatization of these plants in greenhouse conditions.

## VARIABILIDADE GENÉTICA E ANATOMIA FOLIAR COMPARADA DE PLANTAS DE *Dioscorea alata* MANTIDAS EM CULTIVO *IN VITRO*

Erick Marín, Teresa Edith Vargas e Maira Oropeza

### RESUMO

Estudou-se a variabilidade genética e a anatomia foliar de plantas de inhame (*Dioscorea alata*) regeneradas *in vitro* por sistemas de organogênese e micro propagação, em relação com a planta madre mantida em condições de viveiro. Para a determinação da variabilidade genética das plantas regeneradas, se usaram oito iniciadores em uma análise RAPD e se registrou a presença ou ausência de bandas como polimorfismos. Os resultados arrojaram um 0,12% de polimorfismo para ambos os sistemas de regeneração, o que implica que ambos os sistemas são eficientes para multiplicar massivamente esta es-

pécie. O estudo da epiderme e mesófilo das folhas das plantas procedentes do cultivo *in vitro* em comparação com a planta madre se realizou mediante cortes transversais à mão livre. A anatomia foliar das plantas cultivadas *in vitro* é significativamente diferente à da planta madre para as características estudadas; enquanto que não se observaram diferenças entre as plantas obtidas por organogênese e por micro propagação. As diferenças anatômicas observadas não comprometem o sucesso na adaptação destas plantas-*in-vitro* a condições de viveiro.

*Dioscorea alata* (Oropeza *et al.*, 2006), *Sacharum* sp. (Lal *et al.*, 2008), *Centaurea ultrreia* (Mallón *et al.*, 2010), *Chlorophytum borivilianum* (Samantaray y Maiti, 2010), y *Jatropha curcas* (Sarkar *et al.*, 2010; Sharma *et al.* 2011), obtenidas a partir de diferentes sistemas de regeneración *in vitro*.

Otra de las consecuencias del cultivo *in vitro* son las variaciones fenotípicas producto de la adaptación de la planta al medio ambiente de cultivo. Normalmente un alto porcentaje de plantas cultivadas *in vitro* se pierden o se dañan durante el periodo de aclimatación, limitando la aplicación de las técnicas de micropropagación, debido en general a desórdenes causados por el ambiente de cultivo *in vitro*, comparado con las condiciones ambientales de los

cultivos *ex vitro* (Pospíšilová *et al.*, 1999; Zobayed *et al.*, 2001). Durante el cultivo *in vitro* las plantas crecen bajo condiciones muy especiales: la humedad es mayor y la irradiación es menor que en las condiciones de cultivo convencional. El uso de recipientes cerrados para prevenir la contaminación microbiana disminuye la turbulencia del aire, con lo cual se limita la entrada de CO<sub>2</sub> y la salida de los productos gaseosos de la planta.

Estas condiciones afectan el desarrollo y características de las plantas, entre las que se incluyen un pobre desarrollo de la cutícula y un incorrecto funcionamiento de los estomas, lo cual resulta en una excesiva pérdida de agua, una pobre capacidad fotosintética, y anomalías anatómicas, morfológicas y fisiológicas

(Pospíšilová *et al.*, 1999; Zobayed *et al.*, 2001).

En este sentido, Rady y Ali (1999) realizaron la comparación fisiológica y anatómica de plántulas y regenerantes de *Beta vulgaris*, encontrando diferencias en ambos aspectos entre las plantas provenientes de diferentes formas de cultivo. De la misma manera, Zobayed *et al.* (2001) hicieron estudios sobre la anatomía foliar de plantas de *Nicotiana tabacum* y *Brassica oleracea* cultivadas *in vitro*, encontrando que las condiciones de ventilación afectan la anatomía de las plantas regeneradas.

Mohamed y Alsadon (2010) evaluaron la influencia de la ventilación y la concentración de sacarosa (10, 20 y 30g·l<sup>-1</sup>) en el crecimiento y la anatomía foliar de plantas de papa micropropagadas, reportando

que las plantas crecidas en condiciones de ventilación y 20g·l<sup>-1</sup> de sacarosa tenían mayor cantidad de clorofila a, mientras que las crecidas en 10g·l<sup>-1</sup> de sacarosa presentaron mayor cantidad de clorofila b. En cuanto a la densidad de estomas, ésta fue significativamente menor en las plantas crecidas bajo condiciones de ventilación. De la misma manera reportan que las láminas foliares de las plantas crecidas sin ventilación eran más delgadas que las crecidas bajo condiciones de ventilación, además de que no mostraban la epidermis, el parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso estaban bien definidos.

Con base en lo expuesto, en el presente trabajo se evaluó la variabilidad genética y la anatomía foliar en plantas de *D. alata* procedentes del

cultivo *in vitro* (micropropagación y organogénesis) en comparación con la planta madre (*in vivo*), utilizando la técnica RAPD y anatomía foliar comparada, con el fin de validar estos dos sistemas de regeneración *in vitro*.

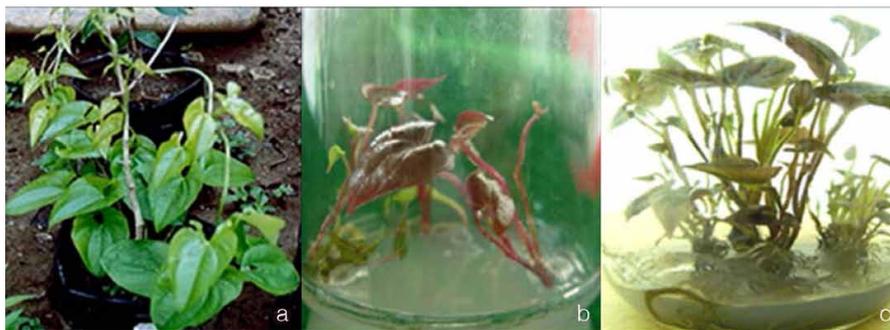


Figura 1. Plantas de *Dioscorea alata* crecida en condiciones de vivero (*in vivo*; planta madre) en a, regenerada por micropropagación (*in vitro*) en b y regenerada por organogénesis (*in vitro*) en c.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal

En este estudio se emplearon plantas de *Dioscorea alata* en condiciones de vivero (*in vivo*), así como regeneradas por micropropagación o vía organogénesis (Figura 1). En el caso de la micropropagación se usaron plantas de 12 semanas de edad regeneradas mediante el cultivo de microesquejes de 1cm de largo con un nudo y 1-2 yemas axilares en medio MM3, el cual contenía sales Murashige y Skoog (1962) suplementado con  $2\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA, según lo reportado por Royero *et al.* (2007). En el caso de la regeneración vía organogénesis se usaron plantas de 12 semanas regeneradas mediante el cultivo de segmentos de tallo de 1cm de largo con 1-2 yemas axilares en medio MO5 el cual contenía sales Murashige y Skoog (1962) suplementado con  $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de ANA y  $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de BA, según lo reportado por Royero *et al.* (2007). Todos los cultivos fueron incubados bajo luz fluorescente continua ( $50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), a  $25^\circ\text{C}$  y se pasaban a medio fresco cada 6 semanas.

Para el análisis molecular se utilizaron 15 plantas de cada sistema de cultivo *in vitro* y la planta en condición de vivero la cual había sido la donante de los explantes para establecer los sistemas *in vitro*.

Para el estudio anatómico se utiliza-

ron 25 preparaciones foliares de cinco plantas provenientes de cada sistema de cultivo *in vitro*, así como de la planta madre.

### Análisis RAPD

La extracción del ADN se realizó según el protocolo propuesto por Oropeza *et al.* (2006), el cual se basa en el método de Doyle y Doyle (1990) con las siguientes variaciones: a) un tratamiento con RNasa 'A' ( $10\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), b) un tratamiento con solución limpiadora: (etanol 76% en  $10\text{mM}$  acetato de amonio ( $\text{NH}_4\text{COOH}$ ), y c) precipitación con  $7,5\text{M}$   $\text{NH}_4\text{COOH}$ .

La evaluación del ADN extraído se realizó mediante el uso de un espectrofotómetro (Thermo modelo Genesys 10 Bio) y se complementó con la electroforesis en gel de agarosa 0,8% para evaluar su integridad, según Sambrook *et al.* (1989). La amplificación del ADN se realizó con ocho iniciadores arbitrarios (Tabla I) según el protocolo planteado

por Ramser *et al.* (1997), llevándose a cabo en un volumen final de  $25\mu\text{l}$  que contenía buffer de reacción 10X ( $50\text{mM}$  KCl,  $10\text{mM}$  Tris-HCL, pH 8,8),  $2\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ;  $0,2\text{mM}$  dNTPs;  $10\text{pM}$  de iniciador;  $100\text{ng}$  de ADN de *Dioscorea alata*; y  $0,6\text{U}$  de Taq polimerasa por reacción. Las condiciones de amplificación se fijaron según el protocolo planteado por Ramser *et al.* (1997):

Un primer ciclo de desnaturalización por 1min a  $94^\circ\text{C}$  (una vez). Un segundo ciclo que consta de tres pasos, un primer paso de desnaturalización de 30s a  $94^\circ\text{C}$ , un segundo paso de alineación de 30s a  $35^\circ\text{C}$  y un tercer paso de elongación de 90s a  $72^\circ\text{C}$ . Este ciclo se repitió tres veces. Por último un ciclo que se repitió 35 veces, constando de un primer paso de desnaturalización de 15s a  $94^\circ\text{C}$ , un segundo paso de alineación de 30s a  $35^\circ\text{C}$  y un tercer paso de elongación de 90s a  $72^\circ\text{C}$ .

Las bandas fueron separadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1,8% y los geles fueron teñidos con bromuro de etidio. Los geles fueron digitalizados en un GEL-DOC (Bio-rad).

### Anatomía foliar comparada

El estudio comparativo de la anatomía foliar se realizó entre la planta de *Dioscorea alata* en condiciones de vivero donadora de los explantes, y las re-

generadas *in vitro* por micropropagación y vía organogénesis. Para lograr esto, el estudio se dividió en dos partes, el estudio de la epidermis (tanto adaxial como abaxial) y el estudio del mesófilo.

**Epidermis.** Se realizaron cortes paradérmicos, tanto de la cara adaxial como de la cara abaxial, en los que se evaluaron los patrones de distribución de los estomas, así como sus tamaños y sus formas, y la forma de las células epidérmicas de cada superficie de la hoja. Este estudio se realizó desprendiendo la epidermis de las hojas con ayuda de pinzas de relojero; los tejidos se montaron en portaobjetos, se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con esmalte para uñas.

**Mesófilo.** Se realizaron cortes transversales a mano alzada de las hojas de las plantas, en los que se evaluó la epidermis, el parénquima empalizada, el parénquima esponjoso y el grosor de la lámina foliar. Para realizar los cortes se utilizaron dos láminas portaobjetos, en el medio de las cuales se coloca la hoja fresca, y manteniendo el portaobjetos de abajo y la hoja fijos, se desliza poco a poco el portaobjetos superior a medida que se realizan los cortes, utilizando como guía para estos cortes, el borde de la lámina del portaobjetos superior (Luis Hermoso, comunicación personal).

Tanto las preparaciones de epidermis como las de mesófilo fueron observadas en un microscopio Nikon Labophot-2.

### Análisis estadístico

Se realizó una comparación de las medias aritméticas de las características medidas en cada uno de los grupos experimentales, y se analizaron estadísticamente empleando pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba *a posteriori* de Duncan, ambas con un nivel de

TABLA I  
SECUENCIA DE LOS INICIADORES  
ARBITRARIOS DE LA SERIE OPC  
DE LA CASA OPERON

Iniciadores arbitrarios	
OPC-15	5' -GAACGGACTC-3'
OPC-17	5' -TGTCATCCCC-3'
OPC-18	5' -CACACTCCAG-3'
OPC-19	5' -GTTGCCAGCC-3'
OPC-20	5' -GTGCCTAACC-3'
OPC-21	5' -TCACGTCCAC-3'
OPC-22	5' -CTCTCCGCCA-3'
OPC-23	5' -GGATGAGACC-3'

significancia de 0,05. Además, se realizó un estudio multivariado de componentes principales (ACP), que utilizó las ocho variables estudiadas para cada uno de los tres grupos experimentales. Los análisis se realizaron con el programa STATISTICA Versión 7.0.

## Resultados

### RAPD de plantas regeneradas por micropropagación

En la Tabla II se resumen los resultados del análisis RAPD para las plantas obtenidas por micropropagación. Se obtuvo un total de 871 bandas altamente reproducibles con un intervalo de peso molecular de 300 a 3500pb, además de un número de bandas producidas que varían entre tres (obtenidas con el iniciador OPC-15) y diez (obtenidas con los iniciadores OPC-18 y OPC-20). La gran mayoría de las bandas son monomórficas a excepción de una banda polimórfica de 800pb resultante de la amplificación con el iniciador OPC-22 que se evidencia en el patrón de bandeado de la planta 13 (Figura 2a).

### RAPD de plantas regeneradas vía organogénesis

La amplificación del ADN de 15 plantas regeneradas vía organogénesis produjo un total de 869 bandas altamente reproducibles, con un intervalo de peso molecular de 300 a 3500pb, además de un número de bandas producidas que varían entre tres (obtenidas con el iniciador OPC-15) y diez (obtenidas con los iniciadores OPC-18 y OPC-20; Ta-

TABLA II  
RESUMEN DEL PATRÓN DE BANDEO OBTENIDO PARA PLANTAS REGENERADAS POR MICROPROPAGACIÓN\*

Iniciadores	Número De bandas	Tallas (pb) de las bandas amplificadas
OPC-15	3	900, 1200, 1300
OPC-17	6	600, 700, 900, 1200, 1900, 3500
OPC-18	10	400, 500, 700, 800, 1000, 1200, 1500, 2000, 2200, 3000
OPC-19	8	700, 850, 1000, 1200, 1300, 1950, 2000, 3000
OPC-20	10	600, 650, 1000, 1100, 1200, 1400, 1600, 1900, 2200, 2500
OPC-21	7	900, 1100, 1300, 1900, 2000, 2100, 3500
OPC-22	9**	300, 600, 650, **800, 1000, 1200, 1300, 2000, 2300, 2900
OPC-23	5	900, 950, 1400, 2500, 3000

\* Se reporta el número de bandas obtenido con cada iniciador y el peso molecular de cada banda.  
\*\* Presencia de una banda polimórfica de 800pb en una de las muestras.

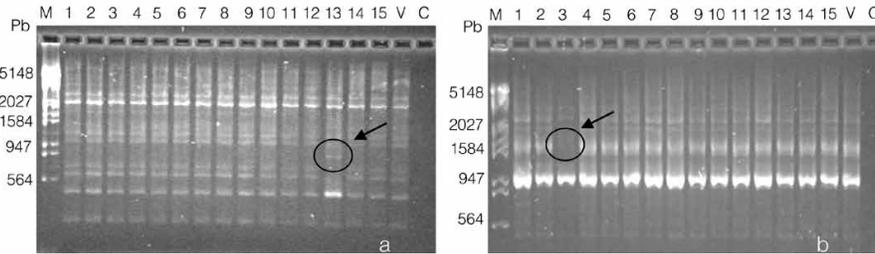


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 1,8% de los patrones de bandas generados mediante RAPD. a: ADN de plantas obtenidas por micropropagación (carriles 1-15), usando el iniciador OPC-22. Se observa polimorfismo en el carril 13 (banda polimórfica de 800pb señalada con la flecha). b: ADN de plantas obtenidas por organogénesis (carriles 1-15), usando el iniciador OPC-23. Se observa polimorfismo en el carril 3 (ausencia de la banda de 1400pb señalada con la flecha). M: marcador de peso molecular, V: ADN de planta *in vivo*, C: control negativo (sin ADN).

bla III). Nuevamente, la gran mayoría de los iniciadores produjeron bandas monomórficas, pero se observa un polimorfismo en la planta 3 con el iniciador OPC-23, que se pone en evidencia con la ausencia de la banda correspondiente a los 1400pb (Figura 2b).

### Anatomía foliar comparada

La Tabla IV muestra los resultados de las mediciones

realizadas de las características anatómicas de hojas de plantas de ñame *in vivo* e *in vitro*, observándose que la planta madre presenta valores mayores para todas las características evaluadas.

Las células de ambas superficies epidérmicas de las plantas regeneradas *in vitro* tienen paredes más sinuosas y son más pequeñas que las que presentan la planta madre (Figura 3c y d). Además

de estas diferencias, se encontraron estomas en la superficie adaxial de las plantas regeneradas *in vitro*, lo cual no se encontró en ninguna de las preparaciones paradermicas adaxiales realizadas a partir de hojas de la planta madre. (Figura 3a).

### Análisis estadístico

El análisis de componentes principales (ACP) para todas las características estudiadas se muestra en la Figura 4, en donde cada 'nube' está generada por la interacción de las características medidas para cada material vegetal (planta en condiciones de vivero, plantas regeneradas vía organogénesis y plantas regeneradas por micropropagación). Se observa que la 'nube' generada por la planta madre se separa de las otras dos 'nubes' generadas por las plantas cultivadas *in vitro*, mientras que estas dos últimas se superponen. Esta disposición de las 'nubes' analizadas junto con el ANOVA y la prueba de Duncan, indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre la planta madre y las plantas regeneradas *in vitro*, mientras que entre las plantas regeneradas *in vitro* solo tres de las características medidas presentan diferencias significativas (Tabla IV).

### Discusión

Mediante el empleo de la técnica RAPD para la estimación de la variabilidad genética de las plantas regeneradas por micropropagación se encontró que de un total de 871 bandas, solamente una fue polimórfica, representando un 0,12% del total (Figura 2). Este

TABLA III  
RESUMEN DEL PATRÓN DE BANDEO OBTENIDO PARA PLANTAS REGENERADAS POR ORGANOGÉNESIS\*

Iniciadores	Número de bandas	Tallas (pb) de las bandas amplificadas
OPC-15	3	900, 1200, 1300
OPC-17	6	600, 700, 900, 1200, 1900, 3500
OPC-18	10	400, 500, 700, 800, 1000, 1200, 1500, 2000, 2200, 3000
OPC-19	8	700, 850, 1000, 1200, 1300, 1950, 2000, 3000
OPC-20	10	600, 650, 1000, 1100, 1200, 1400, 1600, 1900, 2200, 2500
OPC-21	7	900, 1100, 1300, 1900, 2000, 2100, 3500
OPC-22	9	300, 600, 650, 1000, 1200, 1300, 2000, 2300, 2900
OPC-23	5**	900, 950, 1400, 2500, 3000

\* Se reporta el número de bandas obtenido con cada iniciador y el peso molecular de cada banda.  
\*\* Ausencia de la banda de 1400pb para una muestra reflejando polimorfismo.

VALORES PROMEDIOS  $\pm$  DESVIACIONES ESTÁNDAR DE LAS CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LA HOJA DE PLANTAS DE *Dioscorea alata*, VALORES F Y P DEL ANOVA \*

Variable	Planta madre ( <i>in vivo</i> )	Plantas obtenidas por micropropagación	Plantas obtenidas por organogénesis	ANOVA	
				F	p
Epidermis superior ( $\mu\text{m}$ )	74,34 $\pm$ 11,65 a	26,76 $\pm$ 4,00 b	23,86 $\pm$ 4,94 b	325,831	0,000
Parénquima en empalizada ( $\mu\text{m}$ )	49,96 $\pm$ 9,68 a	29,67 $\pm$ 15,89 b	32,97 $\pm$ 4,20 b	23,494	0,000
Parénquima esponjoso ( $\mu\text{m}$ )	76,19 $\pm$ 13,55 a	58,42 $\pm$ 8,12 b	72,19 $\pm$ 12,14 a	14,792	0,000
Epidermis inferior ( $\mu\text{m}$ )	26,42 $\pm$ 8,22 a	18,85 $\pm$ 3,49 b	17,82 $\pm$ 2,81 b	18,154	0,000
Grosor de la lámina foliar ( $\mu\text{m}$ )	226,71 $\pm$ 24,99 a	133,94 $\pm$ 25,00 c	146,84 $\pm$ 3,32 b	130,475	0,000
Densidad estomática ( $\mu\text{m}^2$ )	$2,78 \times 10^{-4} \pm 9,28 \times 10^{-5}$ a	$1,53 \times 10^{-4} \pm 4,96 \times 10^{-5}$ b	$1,77 \times 10^{-4} \pm 6,95 \times 10^{-5}$ b	19,683	0,000
Tamaño de estomas ( $\mu\text{m}$ )	21,81 $\pm$ 2,23 (ancho) a	20,83 $\pm$ 4,49 (ancho) a,b	19,46 $\pm$ 3,30 (ancho) b	7,406	0,001
	27,24 $\pm$ 3,13 (largo) a	23,85 $\pm$ 6,29 (largo)	22,12 $\pm$ 4,61 (largo) b	2,997	0,056
Tamaño de los tricomas glandulares ( $\mu\text{m}$ )	48,54 $\pm$ 520 (ancho) a	37,12 $\pm$ 5,52 (ancho) b	37,17 $\pm$ 3,63 (ancho) b	45,550	0,000
	53,25 $\pm$ 528 (largo) a	43,17 $\pm$ 5,38 (largo) b	39,63 $\pm$ 3,55 (largo) c	54,246	0,000

\* Los valores promedio de cada fila seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo al la prueba de Duncan ( $\alpha=0,05$ ).

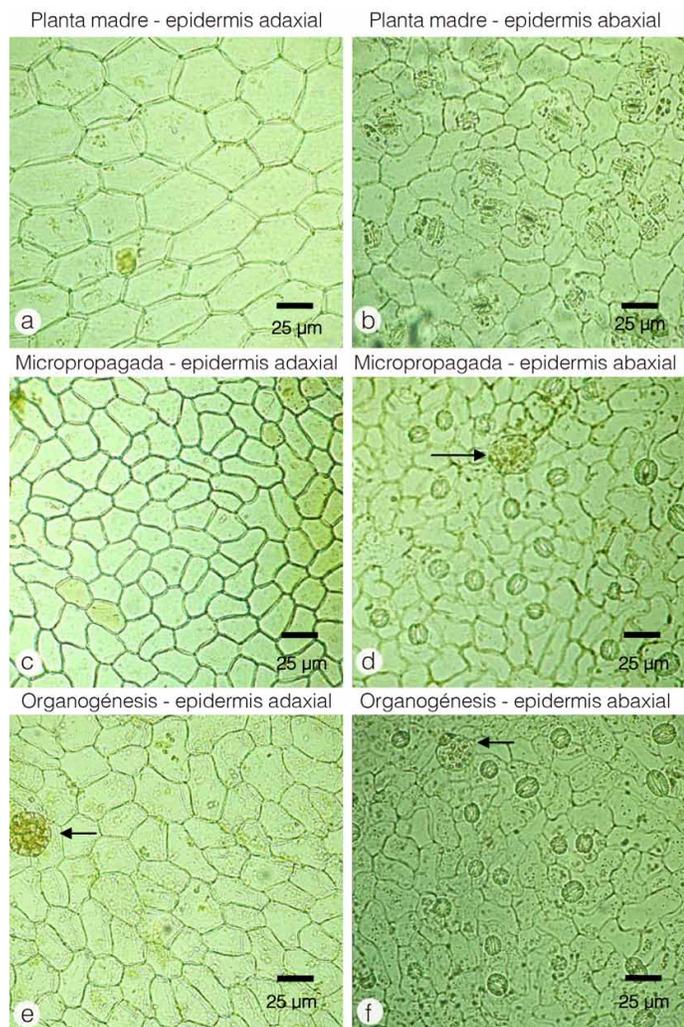


Figura 3. Preparaciones paradérmicas. a: Células con paredes rectas en la epidermis adaxial de la planta madre, b: estomas y las células de paredes sinuosas en la superficie abaxial de la planta madre, c: células con paredes sinuosas en la epidermis adaxial de una planta regenerada por micropropagación, d: estomas, células de bordes altamente sinuosos en la superficie abaxial de una planta regenerada por micropropagación, la flecha señala un tricoma glandular, e: células con paredes sinuosas en la epidermis adaxial de una planta regenerada por organogénesis, f: estomas con células altamente sinuosas en la superficie abaxial de una planta regenerada por organogénesis, la flecha señala un tricoma glandular.

resultado sugiere que el sistema de regeneración de plantas de ñame vía micropropagación establecido por Royero *et al.* (2007) podría usarse efectivamente para la multiplicación *in vitro* de esta especie.

Con el uso del RAPD para la estimación de la variabilidad genética de las plantas regeneradas por organogénesis, se encontró una sola banda polimórfica de un total de 869 bandas obtenidas con los ocho iniciadores usados en las 15 plantas estudiadas, representando el 0,12% del total. Este bajo porcentaje de polimorfismo también valida el proceso de organogénesis establecido por Royero *et al.* (2007).

Debido a la similitud en los porcentajes de variabilidad genética (polimorfismos) obtenidos en este trabajo para ambos sistemas de regeneración *in vitro*, y tomando en cuenta que en el trabajo de Royero *et al.* (2007) se reporta que el sistema de regeneración vía organogénesis produce una mayor cantidad de brotes por explante que la micropropagación (25,15 y 5,75 respectivamente), entonces se puede recomendar el uso de la organogénesis para la regeneración *in vitro* de *Dioscorea alata*. Si bien este sistema tarda seis semanas más que la micropropagación (Royero *et al.* 2007), es mucho más significativa la cantidad de vástagos que se producen en la organogénesis.

La técnica del RAPD es muy popular y ampliamente utilizada con diferentes fines, entre los que destaca el estudio de la estabilidad genética de plantas regeneradas *in vitro*, por lo que existen numerosos reportes de su utilización para tal fin. Los presentes resultados concuerdan con los presentados por Soniya *et al.* (2001), quienes detectaron un 95% de similitud entre 11 plantas de *Lycopersicon esculentum* (tomate) regeneradas *in vitro* y la planta madre excepto una (LS5) que fue significativamente diferente a la donante. En ese trabajo se emplearon diez iniciadores aleatorios, de los cuales seis arrojaron las bandas polimórficas. Igualmente, Prakash *et al.* (2004) observaron que aunque la mayoría de las plantas de *Curcuma amada* eran similares a la planta madre, el uso de diez iniciadores arbitrarios arrojó nueve bandas polimórficas de un total de 103 bandas. Kawiak y Lojkowska (2004) usaron 20 iniciadores aleatorios en 15 plantas regeneradas tanto de *Drosera anglica* como de *D. binata*, encontrando 0,08% de polimorfismo para la primera y 100% de monomorfismo para la segunda.

Más recientemente Lal *et al.* (2008) amplificaron 110 fragmentos y no fue detectada variabilidad genética en plantas micropropagadas de caña de azúcar. Sarkar *et al.* (2010)

utilizaron RAPD y demostraron estabilidad genética en plantas micropropagadas de *Jatropha curcas*; al igual que Sharma *et al.* (2011) usando 21 primers arbitrarios y Leela *et al.* (2011) en plantas micropropagadas de esta misma especie. Resultados similares fueron reportados por Samantaray y Maiti (2010) en plantas de *Chlorophytum borivilianum* usando 33 primers arbitrarios; Peredo *et al.* (2009) demostraron que no había variación genética en plantas micropropagadas de *Humulus lupulus*; Mallón *et al.* (2010) no encontraron alteraciones genómicas en plantas de *Centaurea ultriae* propagadas *in vitro*; y resultados similares fueron encontrados por Ehsan *et al.* (2009) en plantas de naranja obtenidas por organogénesis.

En general, la comparación de nuestros resultados con los reportados en la bibliografía reciente permiten: 1) confirmar el uso de la técnica RAPD para la estimación de la variabilidad genética de plantas obtenidas a partir de sistemas de regeneración *in vitro*; 2) asegurar que en numerosas especies vegetales la micropropagación y la organogénesis pueden ser usadas como técnicas de propagación masiva, ya que la variabilidad genética que presentan las plantas regeneradas por estos métodos es prácticamente nula o nula, y 3) reconsiderar lo reportado por Yang *et al.*, 1999, que postulan que de los sistemas de regeneración *in vitro*, es la organogénesis el que induce mayor variabilidad genética en las plantas regeneradas.

La descripción de la anatomía foliar presentada en este trabajo para las plantas de ñame *in vivo* e *in vitro* coincide con la reportada por Ayensu (1972) para *Dioscorea alata*, con pequeñas diferencias como el tamaño promedio de los estomas, siendo ligeramente más pequeños los reportados en esta investigación. Además, se observaron diferencias significativas entre la planta donante y las plantas *in vitro* en lo concerniente a los tamaños medidos para al-

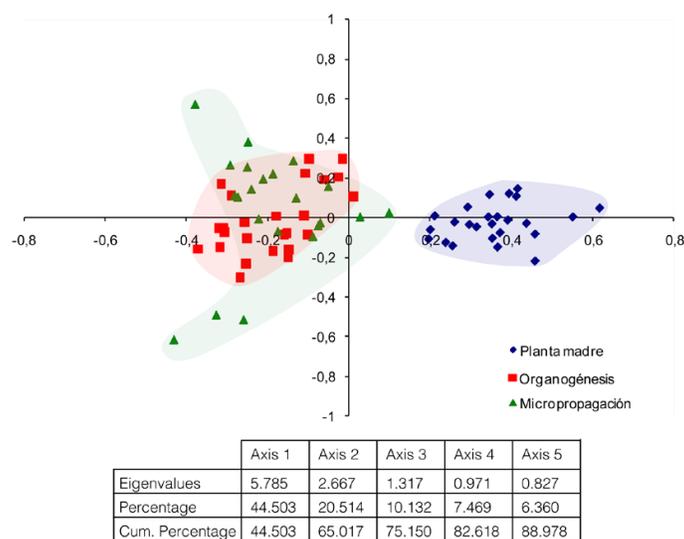


Figura 4. Análisis de componentes principales.

gunas de las características estudiadas.

Existen diferencias significativas en la mayoría de las mediciones de las características anatómicas evaluadas entre la planta crecida en condiciones de vivero y las plantas regeneradas *in vitro*, pero entre las plantas cultivadas vía micropropagación y vía organogénesis estas diferencias no son significativas. La organización de los tejidos es exactamente igual, pero se observaron diferencias en el tamaño de cada característica medida, siendo siempre menores las medidas obtenidas en las hojas de las plantas regeneradas *in vitro*, a excepción del grosor del parénquima esponjoso en las plantas regeneradas por organogénesis y del ancho de los estomas de las plantas regeneradas vía micropropagación, las cuales no mostraron diferencias significativas con respecto a la planta madre. Sin embargo, para el grosor de la lámina foliar y el largo de tricomas glandulares, se identifican tres grupos estadísticamente significativos, mientras que para la característica largo de los estomas, a pesar de que se identifican dos grupos, la diferencia no es significativa (Tabla IV).

Las plantas regeneradas *in vitro* presentaron estomas en ambas caras de la lámina foliar, y las células epidérmicas

adaxiales y abaxiales mostraron paredes sinuosas en comparación con la planta madre. El análisis de componentes principales (Figura 4) corrobora estos resultados, observándose solapamiento de las 'nubes' generadas al analizar los datos obtenidos de las plantas cultivadas *in vitro*, separadas de la 'nube' generada con los datos de la planta crecida *in vivo*.

Las diferencias en las dimensiones medidas, podrían explicarse con base en lo reportado por Pospisilová *et al.* (1999) y Zobayed *et al.* (2001), quienes sostienen que las condiciones ambientales bajo las cuales se desarrollan las plantas cultivadas *in vitro* afectan el desarrollo y características de estas plantas. Aunque la bibliografía sobre este tema en particular no es muy abundante, los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los reportados por Calvete *et al.* (2002), quienes encontraron que las hojas de las plantas regeneradas *in vitro* y *ex vitro* de *Fragaria x ananassa* Duch. (Fresa) son menores y más delgadas que las hojas de la planta *in vivo*, pero en cuanto a la organización de los tejidos, evaluada con cortes transversales de las hojas, ésta fue igual para todas las plantas estudiadas. Barboza *et al.* (2006) reportan sinuosidad en las células epidérmicas de las

plantas de *Ananas comosus* regeneradas *in vitro*, lo que atribuyen a condiciones ambientales pues son formas características de plantas de ambientes húmedos y de sombra, debido a que estas curvaturas de las células epidérmicas aumentan la eficiencia de las hojas para la captación de luz y la intensidad del flujo luminoso al interior de la lámina foliar.

Si las diferencias observadas en estas plantas mantenidas *in vitro* responden a las condiciones ambientales del cultivo y, por lo tanto, revierten al fenotipo de la planta madre crecida *in vivo* cuando pasan por un proceso de aclimatación, entonces se pone en evidencia la plasticidad fenotípica de la especie vegetal en estudio. En este sentido, Calvete *et al.* (2002) encontraron, en las plantas bajo condiciones *ex vitro*, características intermedias entre las plantas bajo condiciones *in vitro* y la planta *in vivo*, demostrándose lo antes expuesto.

Las diferencias en las características anatómicas de las plantas obtenidas *in vitro* en este estudio no comprometen la adaptación de estas plantas a condiciones de vivero, ya que Royero *et al.* (2007) reportan un 70,7% de aclimatación de plantas de ñame obtenidas por micropropagación y organogénesis en su trabajo, y fueron estas mismas plantas las utilizadas para el presente estudio.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Stephen Tillet por la identificación del material vegetal estudiado, a Nelson Ramírez, y Roschman González por la corrección de este manuscrito, y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) de la Universidad Central de Venezuela (UCV) por el financiamiento de este trabajo (proyecto PI-03.33-5447/04).

#### REFERENCIAS

Ayensu ES (1972) *Anatomy of the Monocotyledons*. Oxford

- University Press. Oxford, RU. 154 pp.
- Barboza SBSC, Graciano-Ribeiro D, Teixeira JB (2006) Leaf anatomy of micropropagated pineapple plants. *Pesq. Agropec. Bras.* 41: 185-194.
- Calvete EO, Azevedo M, Bordignon MH (2002) Análises anatómicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. *Hort. Bras.* 20: 649-653.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Ehsan UK, Xing-Zheng F, Jing W, Qi-Jun F, Xiao-San H, Ge-Ning Z, Jie S, Ji-Hong L (2009) Regeneration and characterization of plants derived from leaf *in vitro* culture of two sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) cultivars. *Sci. Hort.* 120: 70-76.
- Kaeppeler SN, Phillips RL (1993) DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 29: 125-130.
- Kawiak A, Lojkowska E (2004) Application of RAPD in the determination of genetic fidelity in micropropagated *Drosophila* plantlets. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 40: 592-595.
- Lal M, Singh RK, Srivastava S, Singh N, Singh SP, Sharma ML (2008) RAPD marker based analysis of micropropagated plantlets of sugarcane for early evaluation of genetic fidelity. *Sugar Technol.* 10: 99-103.
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 197-214.
- Leela T, Naresh B, Reddy MS, Madhusudhan NC, Cherku PD (2011) Morphological, physico-chemical and micropropagation studies in *Jatropha curcas* L. and RAPD analysis of the regenerants. *Appl. Energy* 88: 2071-2079.
- Mallón R, Rodríguez-Oubiña J, González ML (2010) *In vitro* propagation of the endangered plant *Centaurea ulreia*: assessment of genetic stability by cytological studies, flow cytometry and RAPD analysis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 101: 31-39.
- Mohamed MA, Alsadon AA (2010) Influence of ventilation and sucrose on growth and leaf anatomy of micropropagated potato plantlets. *Sci. Hort.* 123: 295-300.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissues culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Oropeza M, Erick M, Vargas T (2006). Establecimiento de un protocolo RAPDs eficiente para plantas de ñame. *Agron. Trop.* 56: 601-606.
- Oropeza M, Guevara P, García E, Ramírez JL (1995) Identificación de somaclonal variants of sugarcane (*Saccharum* spp.) resistant to Sugarcane Mosaic Virus via RAPD markers. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 182-191.
- Peredo EL, Arroyo-García R, Revilla MA (2009) Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. *J. Plant Physiol.* 166: 1101-1111.
- Peschke V, Phillips R (1992). Genetic implication of somaclonal variation in plants. *Adv. Genet.* 3: 41-77.
- Phillips RL, Kaeppeler SM, Peschke VM (1990). *Do we understand somaclonal variation?* En Nijkamp HJJ, Van Der Plas LHW, Van Aartrijk J (Eds.) *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer. Amsterdam, Holanda. 227 pp.
- Pospíšilová J, Tichá I, Kadlecěk P, Haisel D, Plzasáková S (1999). Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol. Plant.* 42: 481-497.
- Prakash S, Elangomathavan R, Seshadri S, Kathiravan K, Ignacimuthu S (2004) Efficient regeneration of *Curcuma amada* Roxb. plantlets from rhizome and leaf sheath explants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 78: 159-165.
- Rady MR, Ali ZA (1999) Comparison of physiology and anatomy of seedlings and regenerants of sugar beet. *Biol. Plant.* 42: 39-48.
- Ramser J, Weising K, Chikaleke V, Kahl G (1997) Increased informativeness of RAPD analysis by detection of microsatellite motifs. *Biotechniques* 23: 285-290.
- Royero M (2004) Regeneración *in vitro* de *Dioscorea alata* (ñame). Tesis. Universidad Central de Venezuela. Caracas. Venezuela. 136 pp.
- Royero M, Vargas TE, Oropeza M (2007) Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (ñame). *Interciencia* 32: 247-252.
- Samantaray S, Maiti S (2010) An assessment of genetic fidelity of micropropagated plants of *Chlorophytum borivillanum* using RAPD markers. *Biol. Plant.* 54: 334-338.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Nueva York, EEUU. 346 pp.
- Sarkar TK, Vijay KG, Reddy MP (2010) Effect of nickel on regeneration in *Jatropha curcas* L. and assessment of genotoxicity using RAPD markers. *Biometals* 3: 1149-1158.
- Scowcroft WR, Brettell RIS, Ryan SA, Davies PA, Pallotta MA (1987). Somaclonal variation and genomic flux. En Green CE, Somers DA, Hackett WP, Biesboes DD (Eds.) *Plant Tissue and Cell Culture* Liss, Nueva York, EEUU. pp. 275-286.
- Sharma SD, Sudheer VN, Vijay KG, Reddy MP (2011) Assessment of genetic stability in micropropagules of *Jatropha curcas* genotypes by RAPD and AFLP analysis. *Ind. Crops Prod.* 34: 1003-1009.
- Soniya EV, Banerjee NS, Das MR (2001) Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. *Curr. Sci.* 80: 1213-1215.
- Williams JG, Hanafey MK, Rafalski JA, Tingey S (1990) Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzymol.* 218: 704-740.
- Yang H, Tabei Y, Kamada H, Rayano T (1999) Detection of somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA. *Plant Cell Rep.* 18: 520-526.
- Zhao Y, Brian WW, Crisp P (2005) Variations in morphology and disease susceptibility of micropropagated rhubarb (*Rheum raphaniticum*) PC49, compares to conventional plants. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 82: 357-361.
- Zobayed SMA, Armstrong J, Armstrong W (2001) Leaf anatomy of *in vitro* tobacco and cauliflower plantlets as affected by different types of ventilation. *Plant Sci.* 161: 537-548.