

**Estudio fenotípico y molecular en plántulas de
camote (*Ipomoea batatas* L. Lam.) propagadas
*in vitro***

Wily Rodrigo Sic Hernández

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Estudio fenotípico y molecular en plántulas de
camote (*Ipomoea batatas* L. Lam.) producidas
*in vitro***

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Wily Rodrigo Sic Hernández

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2019

Estudio fenotípico y molecular de plántulas de camote (*Ipomoea batatas* L. Lam.) producidas *in vitro*

Wily Rodrigo Sic Hernández

Resumen. El aumento de la producción de plántulas de camote *in vitro* puede ser alcanzada incrementado el número de subcultivos, pero se debe asegurar que las plántulas regeneradas mantengan su pureza genética. Los objetivos de este estudio fueron: 1. Realizar una caracterización fenotípica de las plántulas comerciales de camote producidas *in vitro*. 2. Optimizar un protocolo de extracción de ADN de plántulas de camote producidas *in vitro*. 3. Identificar cebadores tipo RAPD para la amplificación de fragmentos de ADN de camote. Se utilizaron plántulas de camote de la variedad Buschbuk regeneradas por organogénesis directa y multiplicada durante cuatro subcultivos, se les extrajo ADN y se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando 30 cebadores RAPD. Durante los primeros 10 días de crecimiento *in vitro* las plántulas presentaron hojas de forma ovada con dos secciones nodales, a los 20 días los órganos se tornaron ligeramente moradas con la presencia de tricomas y a los 30 días desarrollaron raíces adventicias. El protocolo optimizado permite la obtención de ADN de calidad y en concentraciones superiores a 10 ng/ μ L, para su optimización se estandarizó el peso de la muestra vegetal a 60-70 mg y se realizaron cambios en los ciclos de precipitado y centrifugado. Durante la extracción no se tuvieron problemas con compuestos fenólicos que puedan contaminar la muestra de ADN. Se identificaron 6 cebadores que amplificaron bandas con fragmentos claramente puntuables, de alta intensidad, pero no fueron repetibles, estos cebadores tienen potencial para ser utilizados en estudios de variabilidad genética en camote.

Palabras clave: Cebadores, cultivo *in vitro*, polifenoles, variación somaclonal.

Abstract. The increased production of sweet potato seedlings *in vitro* can be achieved by increasing the number of subcultures, but it must be ensured that the regenerated seedlings keep their genetic purity. The objectives of this study were: 1. Perform a phenotypic characterization of commercial sweet potato seedlings produced *in vitro*. 2. Optimize a DNA extraction protocol for sweet potato seedlings produced *in vitro*. 3. Identify primers type RAPD for amplification of sweet potato DNA fragments. Sweet potato seedlings of the Buschbuk variety regenerated by direct and multiply organogenesis, used for four subcultures, DNA was extracted and the Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed using 30 RAPD primers. During the first 10 days of *in vitro* growth, the seedlings presented oval-shaped leaves with two nodal sections, at 20 days the organs became slightly purple with the presence of trichomes and at 30 days, they developed adventitious roots. The optimized protocol allows obtaining quality DNA and in concentrations higher than 10 ng/ μ L, for optimizing the weight of the plant sample was standardized to 60-70 mg and changes were made in the precipitate and centrifuge cycles. During the extraction, no problems were presented with phenolic compounds that could contaminate the DNA sample. Six primers were identified that amplified bands with clearly punctuated fragments, of high intensity, but were not repeatable; these primers have the potential to be used in studies of sweet potato genetic variability.

Key words: *In vitro* crop, primers, polyphenols, somaclonal variation.

CONTENIDO

Portadilla.....	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES.....	18
5. RECOMENDACIONES.....	19
6. LITERATURA CITADA.....	20

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Marcadores moleculares RAPD utilizados para amplificar fragmentos de ADN de camote.....	6
2. Características fenotípicas típicas de plántulas de camote cultivadas <i>in vitro</i>	8
3. Protocolo optimizado para extraer ADN de camote.....	10
4. Concentraciones de ADN obtenidas utilizando el protocolo utilizado en el Laboratorio de Biotecnología para la extracción de ADN en frijol	11
5. Concentraciones de ADN obtenidas con muestras entre 30-40 mg de material vegetal utilizando el protocolo optimizado para extracción de ADN en camote..	11
6. Concentraciones de ADN obtenidas con muestras entre 60-70 mg de material vegetal utilizando el protocolo optimizado para extracción de ADN en camote...	12
Figuras	Página
1. Plantas regeneradas de camote (<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.) cv Bushbuck por organogénesis directa. Plántula con 10 (A), 20 (B) y 30 (C) días de crecimiento <i>in vitro</i>	8
2. Gel de calidad de 15 muestras de ADN extraídas de muestras con 30-40 mg de material vegetal de camote, utilizando el protocolo optimizado.....	14
3. Gel de calidad de 15 muestras de ADN extraídas de muestras con 60-70 mg de material vegetal de camote, utilizando el protocolo optimizado.....	14
4. Productos amplificados de PCR generados por nueve cebadores en dos plántulas micropropagadas de camote.....	15
5. Productos amplificados de PCR generados por nueve cebadores en dos plántulas micropropagadas de camote.....	15
6. Productos amplificados de PCR generados por nueve cebadores en dos plántulas micropropagadas de camote.....	16
7. Productos amplificados de PCR generados por tres cebadores en dos plántulas micropropagadas de camote.....	17

1. INTRODUCCIÓN

El camote (*Ipomoea batatas* L. Lam) es un cultivo de clima tropical, originario de México y Centro América, destacándose a nivel mundial como el séptimo cultivo alimentario más importante en términos de producción (Arguedas *et al.* 2015). Para la región centroamericana este cultivo es importante para la seguridad alimentaria, debido a su contenido de azúcares, betacarotenos y vitaminas, además de su bajos costo de producción.

Para la producción masiva de material de propagación de camote se ha utilizado la propagación *in vitro*, utilizando las técnicas de cultivo de tejidos. El laboratorio de cultivo de tejidos de Zamorano produce plántulas de camote a partir de organogénesis directa, realizando cuatro subcultivos y produciendo aproximadamente 2,400 plántulas por explante. Una alternativa para incrementar la producción es incrementar el número subcultivos, evitando regresar a la fase de establecimiento, la cual es un punto crítico durante su producción. Sin embargo, existen varios estudios que demuestran que el incremento en el número de subcultivos podría generar variación genética en las plántulas cultivadas (Rodrigues *et al.* 1998; Ray *et al.* 2006; Krishna *et al.* 2016). Esta variación es conocida como variación somaclonal y se define como cambios genéticos y epigenéticos observados en plantas regeneradas a partir de cultivo de tejidos (Skirvin *et al.* 1978; Larkin y Scowcroft 1981; Rodriguez-Enriquez *et al.* 2011; Bhojwani y Cantu 2013; Sahijram 2015), probablemente como una respuesta al estrés (Cardone *et al.* 2010; Bairu *et al.* 2011; Vázquez y Linacero 2010) y provocada por la variabilidad pre-existente de las células del explante (Cardone *et al.* 2010; Bhojwani y Dantu 2013) y/o inducidas por las condiciones *in vitro* del laboratorio (Bajaj 1990; Pierik 1997).

La variabilidad somaclonal es indeseable cuando el objetivo es la multiplicación de clones de élite (Bhojwani y Dantu 2013), aunque puede ser una fuente de variabilidad que permite generar nuevas variedades con características deseables y ventajas agronómicas. En ambos casos es necesario realizar estudios de caracterización fenotípica, estabilidad y variabilidad genética para determinar su ocurrencia. Esto se logra utilizando la regeneración de plantas *in vitro*, crecimiento de las plantas en invernadero y pruebas de campo (Tabares *et al.* 1991).

La identificación de variación somaclonal puede ser realizada por estudios fenotipicos y estudios moleculares. Los estudios fenotipicos permiten la identificación de variaciones basados en caracteres como diferencia en la altura de la planta, morfología foliar, susceptibilidad o resistencia a enfermedades, cambios morfológicos en la raíz y cambios en

el rendimiento (Bairu *et al.* 2011). La detección fenotípica de variación somaclonal generalmente es realizada durante la etapa de climatización o ya cuando las plantas se encuentran establecidas en campo; la mayoría de laboratorios comerciales regularmente toman muestras de sus plantas y las cultivan en campo o invernadero para asegurarse que se mantienen las características del cultivar (Skirvin *et al.* 1994). Por lo que estudios de variación fenotípica y molecular durante el crecimiento *in vitro* son una alternativa para la detección temprana de variación somaclonal. Para realizar un estudio de variación fenotípica de las plántulas producidas *in vitro* es necesario conocer el fenotipo típico de las plántulas. Luego se debe corroborar su ocurrencia con estudios moleculares, ya que algunas variaciones son inestables y pueden observarse en etapas juveniles y desaparecer cuando las plantas ya están establecidas en campo (Skirvin *et al.* 1994).

El aislamiento de ADN genómico de alta calidad y en suficiente cantidad es un requisito importante previo a la realización de estudios moleculares (Dabo *et al.* 1993; Aljanabi *et al.* 1999; Dhakshanamoorthy y Selvaraj 2009; Alejos-Velázquez *et al.* 2010). La primera limitante en la extracción de ADN en camote es su alto contenido de polifenoles; de dos a tres veces mayor que en algunos cultivos vegetales comunes (Musilová *et al.* 2017). Este compuesto dificulta la extracción de ADN. El contenido de estos compuestos en plántulas producidas *in vitro* aún no es reportado, por lo que no se conoce si es una limitante en la extracción de ADN en este tipo material vegetal. Actualmente se han descrito varios procedimientos de extracción de material genético en plantas con altas cantidades de polifenoles y polisacáridos tales como la purificación por cloruro de cesio, el uso de nitrógeno líquido (John 1992) o polivinilpirrolidona (PVP) (Porebski *et al.* 1997; Dhakshanamoorthy y Selvaraj 2009), sin embargo, estos protocolos son tediosos o requieren de reactivos costosos y equipos sofisticados. Esto genera la necesidad de generar un protocolo rápido y eficiente para la extracción de ADN en camote, que provea de material genético de alta pureza y en gran cantidad y sea adapte a la tecnología disponible en el Laboratorio de Biotecnología de Zamorano.

Otro factor a considerar en estudios de variabilidad genética es la identificación de cebadores que generen bandas de alta intensidad, reproducibles y con fragmentos claramente puntuables. La reproductibilidad de los perfiles amplificados por marcadores moleculares está influenciada por cualquier variación en el método de extracción de ADN, la concentración de ADN, el cebador, la concentración de Taq, la temperatura de recocido, el número de ciclos térmicos y la concentración de MgCl (Gaafar y Saker 2006).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Realizar una caracterización fenotípica de las plántulas comerciales de camote producidas *in vitro*.
- Optimizar un protocolo de extracción de ADN de plántulas de camote producidas *in vitro*.
- Identificar cebadores tipo RAPD para la amplificación de polimorfismo en camote.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

El estudio fue realizado entre los meses de marzo a septiembre del 2019, en los Laboratorios de Cultivo de Tejidos y Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras, ubicada en el Valle del Yegüare a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

Material Vegetal.

Se utilizaron plántulas de camote de la variedad Bushbuck producidas *in vitro* y establecidas a partir de domos meristemáticos. Estas plántulas fueron establecidas en un medio de sales basales de Murashige y Skoog (MS) y multiplicadas en un medio de cultivo de Murashige y Skoog modificada para camote. Durante el establecimiento las plántulas se mantuvieron 20 días en oscuridad completa, seguidos de 5 días sin luz directa y finalmente se expusieron a luz directa durante 43 días previo a su multiplicación. Las condiciones ambientales en la etapa de establecimiento y multiplicación se mantuvieron con una humedad relativa entre 50-60%, a 22-24 °C. Se utilizaron lámparas con luz LED durante 16 horas diarias con una intensidad lumínica de 4 k Lux, con una Radiación Fotosintéticamente Activa (PAR) de 40 $\mu\text{m}^2/\text{s}$. Desde el establecimiento hasta la primera multiplicación transcurrieron 67 días, luego se realizaron subcultivos cada 21 días, hasta alcanzar el cuarto subcultivo.

Caracterización Fenotípica.

Se identificaron todas las plantas micropropagadas a partir de un mismo explante y después del establecimiento del cuarto subcultivo se tomaron 10 plántulas cada 10 días de crecimiento *in vitro*, muestreando un total de 30 plántulas. Se observó el fenotipo de cada planta durante cada semana de crecimiento y se observaron las siguientes características: número de nudos, presencia de raíces adventicias, forma, tamaño y color de las hojas, tamaño de raíces, tamaño de la planta regenerada, color del ápice apical, nervaduras, peciolo y tallo.

Optimización del protocolo de extracción de ADN.

Las primeras extracciones se realizaron utilizando el protocolo de extracción de ADN para frijol utilizado en el laboratorio de Biotecnología sin ninguna modificación, para identificar puntos críticos que afecten directamente la extracción de ADN en camote. Para optimizar este protocolo en las siguientes extracciones se utilizaron dos cantidades de material vegetal y se realizaron modificaciones principalmente en el tiempo de los ciclos de precipitación y las revoluciones por minuto en los ciclos de centrifugado.

Obtención de la muestra foliar. Se cosechó tejido fresco de 60 plántulas de camote (6-8 mitades de hojas jóvenes). Fue necesario definir la cantidad exacta de material vegetal a utilizar; se realizaron 30 extracciones con muestras de 30-40 mg y luego se realizaron otras 30 extracciones con muestras de 60-70 mg.

Lisis celular y separación de componentes celulares. A cada muestra se le agregó 50 μ L del buffer de extracción (PEX) en un tubo para microcentrífuga eppendorf de 1.5 mL. El tejido se maceró en el tubo usando una barra de plexiglás, se agregaron 450 μ L adicionales de buffer PEX y se agitaron en el vortex. Lo más pronto posible (antes de una hora), se colocaron los tubos con las muestras de tejido en baño maría a 65 °C durante 45 minutos. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos inicialmente a 14,000 RPM (alta velocidad) usando una microcentrífuga para concentrar los residuos de tejido (pellet); pero no se logró una adecuada separación de los sólidos por lo que las revoluciones por minuto se incrementaron paulatinamente. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio.

Degradación de proteínas y precipitación de ácidos nucleicos. Se precipitaron los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de etanol: acetato de amonio 7.5 M. El contenido se mezcló invirtiendo los tubos y se dejaron precipitar por 30 min a temperatura ambiente. Se agitaron los tubos manualmente para romper el precipitado. Se peletearon los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando las muestras a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 minutos en una microcentrífuga. Se eliminó el sobrenadante.

Degradación de ARN y extracción de contaminantes. Agregando a los tubos con los pellets 300 μ L de RNAas A (concentración de 100 μ L/mL) + buffer TE 0.1X (juntas): se agitaron los tubos manualmente y se incubaron en baño maría a 37 °C por 1 hora. Luego se centrifugaron las muestras a >14,000 RPM por 1 minuto, para peletizar los residuos de tejido remanentes. El tiempo de centrifugado se fue aumentando paulatinamente hasta que los tejidos remanentes quedaron completamente separados. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL.

Precipitado de ADN. Se precipitó el ADN llenando los tubos con una mezcla 10:1 de etanol: acetato de sodio 3M. Se mezclaron invirtiendo los tubos y se precipitaron a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a 30 minutos. Se agitaron los tubos manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletizarlo. Se centrifugaron las muestras por 5 minutos a 3,000 RPM para peletizar el ADN. El tiempo de centrifugado se fue aumentando paulatinamente hasta que el sobrenadante haya quedado completamente separado. Se vació el etanol/acetato de sodio y se lavaron los pellets llenando los tubos con 70% etanol; se agitaron manualmente. Los pellets se colectaron centrifugando los tubos por 15 segundos a 14,000 RPM. El tiempo de centrifugado se fue aumentando paulatinamente, hasta que no se observara sobrenadante en la solución. Se vació el etanol y se dejaron secar los pellets invirtiendo los tubos sobre papel toalla (2-3 horas o de un día a otro).

Hidratación de ADN. Se agregaron 50 μ L de buffer TE 0.1X a los tubos con el pellet. Se agitaron en el vortex y se colocaron en baño maría a 65 °C durante 15 min.

Cuantificación de ADN. Se utilizó el equipo “QuantiFluor® ONE ds DNA System en el fluorómetro Quantus™ Fluorometer” de la marca Promega. Se utilizaron tubos de 0.5 mL para cada muestra de ADN, agregándoles una mezcla de 199 µL de buffer TE 1X más 1 µL de ADN. Adicionalmente a las muestras de ADN se preparó una muestra blanca y otra estándar para calibrar el equipo y determinar la concentración de ADN.

Determinación de la calidad del ADN. Para determinar la calidad de ADN extraído se realizó electroforesis en gel de agarosa. Se mezclaron 5 µL de ADN genómico con 2 µL de buffer de carga 6X. La mezcla se colocó en un gel de agarosa al 1.5% con una solución tampon TE 0.5X. El gel de agarosa se tiñó con una solución 1:10 de SYBR® Green. La migración de ADN se realizó a 100 voltios durante 1 hora 45 minutos en una bandeja de electroforesis horizontal. El resultado final se visualizó en el transluminador BENCHTOP 2UV™ TRANSILLUMINATORS para verificar la integridad del ADN.

Identificación de cebadores RAPD amplificables para camote.

Dilución del ADN. Las muestras de ADN extraídas se diluyeron a una concentración final de 10 ng/µL, con buffer TE 0.1X; concentración requerida por los marcadores RAPD. La fórmula utilizada fue: $Volumen1 \times Concentración1 = Volumen2 \times Concentración2$.

Amplificación del ADN. Se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando 30 cebadores RAPD (Cuadro 1) utilizados en el Laboratorio de Biotecnología de Zamorano para amplificar de fragmentos de ADN de cultivo de frijol. En un tubo para PCR se realizó la mezcla maestra agregando 3.4 µL de dd H₂O, 1.5 µL de PCR buffer 5X Green y 1.5 dNTP'S sin MgCl₂, se mezclaron con ayuda de una micropipeta. Se agregaron 0.6 µL de cebador (F), 0.5 µL de Taq polimerasa y 7.5 µL del ADN a una concentración de 10 ng/µL, se mezclaron de nuevo. A las muestras se les agregó una gota de aceite mineral y se sellaron con papel aluminio adhesivo para evitar evaporación. La amplificación se realizó en el termociclador TECHNE TC-512 con un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 min, seguida de 35 ciclos de: 45 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de acoplamiento a 35 °C, 1 minuto 15 segundos de extensión a 72 °C, seguidos por un ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 minuto y el mantenimiento a 15 °C.

Visualización de ADN. El producto de la PCR se visualizó mediante la técnica de electroforesis, utilizando geles de agarosa al 1.5% en una solución tampon TE 0.5X (Tris-HCL, pH de 7.4; con ácido bórico, EDTA) en pozos para electroforesis. El gel de agarosa se tiñó con una solución 1:10 de SYBR® Green, este compuesto se asocia a la molécula de ADN introduciéndose en la estructura secundaria de la doble hélice y acoplándose a los ácidos nucleicos para aumentar la tasa de fluorescencia en el transiluminador. Las bandas fueron separadas a 100 voltios durante 1 h 45 min en una bandeja de electroforesis horizontal. El tamaño de los fragmentos de ADN identificados se determinó utilizando una escalera molecular de 100 pares de bases.

Cuadro 1. Marcadores moleculares RAPD utilizados para amplificar fragmentos de ADN de camote.

Cebador	Secuencia
OPA-02	TGCCGAGCTG
OPAC-15	TGCCGTGAGA
OPB-10	CTGCTGGGAC
OPB-15	GGAGGGTGTT
OPC-04	CCGCATCTAC
OPC-11	AAAGCTGCGG
OPD-08	GTGTGCCCCA
OPF-13	GGCTGCAGAA
OPG-03	GAGCCCTCCA
OPG-05	CTGAGACGGA
OPG-06	GTGCCTAACC
OPG-08	TCACGTCCAC
OPH-04	GGAAGTCGCC
OPH-08	GAAACACCCC
OPH-20	GGGAGACATC
OPI-16	TCTCCGCCCT
OPO-05	CCCAGTCACT
OPO-13	GTCAGAGTCC
OPO-19	GGTGCACGTT
OPP-09	GTGGTCCGCA
OPQ-09	GGCTAACCGA
OPQ-14	GGACGCTTCA
OPR-02	CACAGCTGCC
OPT-07	CCTCTCGACA
OPT-15	GGATGCCACT
OPU-01	ACGGACGTCA
OPU-19	GTCAGTGCGG
OPV-10	GGACCTGCTG
OPW-13	CACAGCGACA
OPY-06	AAGGCTCACC

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fenotípica de plántulas de camote producidas *in vitro*.

La producción de camote inició con el establecimiento de domos meristemáticos por organogénesis directa. La multiplicación se realizó con segmentos nodales. La formación de raíces se observó a partir del tercer y cuarto día del establecimiento y el crecimiento de los brotes a partir del quinto día. Diez días después de la multiplicación se observaron plántulas de 0.71 cm con dos segmentos nodales; las hojas y ápice apical presentaron color verde, el peciolo de la hoja inferior presentó una coloración morada y la de la hoja superior una coloración verde, los lóbulos de las hojas aún no se encontraban definidas y mantenían una forma ovada, las nervaduras de las horas de color verde claro, el tallo es ligeramente morado y desarrollo entre 2 a 3 brotes radiculares (Figura 1).

Cuando las plántulas cumplieron 20 días de crecimiento *in vitro* se observó un incremento en el número de raíces y brotes laterales (Cuadro 2). Los colores de los órganos no cambiaron bruscamente; las hojas mantuvieron su color verde con nervaduras verde claro y con forma ovada, el ápice apical se tornó de color morado y se diferenció del tallo que cambió a color verde, los peciolos de las hojas superiores se tornaron ligeramente morado y la de las hojas inferiores de color verde. También se observó el crecimiento de tricomas, agrupadas principalmente en el peciolo y las hojas.

Con 30 días de crecimiento *in vitro* las plántulas presentaron un crecimiento más acelerado, se duplicó el tamaño de la plántula y las raíces tuvieron un mayor crecimiento lateral. El ápice apical, los peciolos, nervaduras y bordes de las hojas superiores se tornaron de color morado, el tallo y peciolo de las hojas inferiores mantenía su color verde. Se incrementó el número de segmentos nodales y se observó el crecimiento de raíces adventicias de color blanco en la parte media de las plántulas. Las hojas de la parte superior presentaban una forma cordada y eran de mayor tamaño que las hojas inferiores, que aún mantenían pubescencia y su forma ovoide.

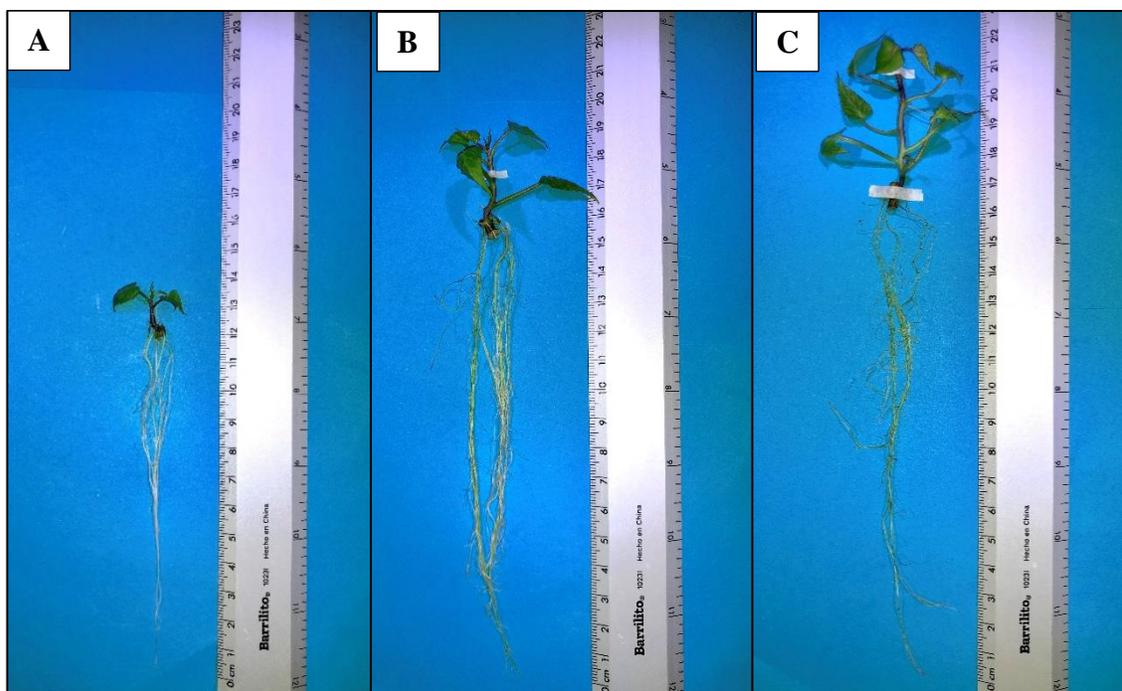


Figura 1. Plantas regeneradas de camote (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cv Bushbuck por organogénesis directa. Plántula con 10 (A), 20 (B) y 30 (C) días de crecimiento *in vitro*.

Cuadro 2. Características fenotípicas típicas de plántulas de camote cultivadas *in vitro*.

Parámetro	Días		
	10	20	30
Tamaño de la plántula (cm)	0.71 ± 0.22	2.42 ± 0.64	5.33 ± 1.06
Largo de la hoja (cm)	1.22 ± 0.37	1.42 ± 0.27	1.88 ± 0.19
Ancho de la hoja (cm)	0.66 ± 0.10	0.9 ± 0.16	1.14 ± 0.14
Tamaño del peciolo (cm)	0.66 ± 0.13	1.15 ± 0.17	1.80 ± 0.15
Tamaño de la raíz (cm)	10.95 ± 1.52	16.83 ± 2.83	18.28 ± 2.09
No. nudos	2.00 ± 0.5	4.00 ± 1.32	7.00 ± 0.44
Peso (mg)	0.13 ± 0.05	0.43 ± 0.17	0.73 ± 0.12

Para la producción comercial de plántulas se realizan cuatro subcultivos, obteniendo aproximadamente 2,400 plántulas a partir un explante establecido. Estas plántulas son adquiridas y producidas por agricultores externos a Zamorano. Durante su producción en campo las plántulas no muestran ningún indicio de variación somaclonal y los agricultores están satisfechos con los rendimientos obtenidos. Considerando los resultados observados en campo, el Laboratorio de Cultivo de Tejidos podría incrementar el número de subcultivos. Esto permitiría producir una mayor cantidad de plantas en menor tiempo, ya que no se tendría que iniciar desde el establecimiento del domo meristemático, permitiendo un incremento en sus ingresos. Sin embargo, para incrementar el número de subcultivos el laboratorio de cultivo de tejidos debe asegurar la pureza genética de las plántulas producidas *in vitro*.

Se han desarrollado varios estudios del comportamiento de las plantas regeneradas *in vitro*, en estos estudios las plantas regeneradas son transferidas a invernadero y posteriormente trasplantadas a campo, en campo realizan evaluaciones del fenotipo de las plantas, midiendo variables como la cobertura de la planta, forma, color, tamaño y pigmentación de la hoja, tamaño y color de la raíz, hábito de crecimiento, hábito de floración y defectos en la raíz. Un estudio de evaluación agronómica de la variación somaclonal en camote reporta la aparición de 50 plantas con variaciones somaclonales morfológicas, identificadas visualmente, de 100 plantas regeneradas por organogénesis directa (Delgado-Paredes *et al.* 2017), la característica con mayor variabilidad fue la longitud del entrenudo. Otro estudio realiza mediciones de variaciones en el tipo de hoja, color de la vena, color del peciolo, color de la piel de la raíz, forma de la raíz y sabor después de vapor, para producir mutantes útiles por irradiación crónica, sus resultados demuestran la aparición de mutantes con alteración del color de la raíz (de amarillo a anaranjado) y el rendimiento (de 218.8 g a 646.9 g) (Wang *et al.* 2007). También se han realizado estudios de las plantas aún en laboratorio, uno de estos estudios se basa en la evaluación fenotípica para detectar variación somaclonal de plántulas regeneradas en condiciones de estrés por salinidad, evaluando parámetros: número de raíces, longitud de raíces, condición de hoja y raíz) obteniendo una variación significativa en la tolerancia a salinidad entre las plantas regeneradas y las de control (Anwar *et al.* 2010).

Algunos cambios genéticos son difíciles de observar a nivel morfológico o fisiológico debido a la diferencia estructural en el producto génico que no altera su actividad biológica lo suficiente para producir un fenotipo diferente, a pesar de no observar cambios bruscos o anomalías en la morfología no se niega la posibilidad de variaciones genéticas. Además, la identificación fenotípica de campo se ve fuertemente afectada por factores ambientales y pueden no reflejar la verdadera composición genética de la planta (Mandal *et al.* 2001). Realizar un estudio de variabilidad fenotípica de las plántulas producidas *in vitro* permitiría la detección temprana de anomalías que podrían implicar variación somaclonal.

Protocolo optimizado para la extracción de ADN en plántulas de camote producidas *in vitro*.

Se optimizó el protocolo para extracción de ADN en cultivo de camote, se cosechó entre 60-70 miligramos de material vegetal, se le agregó 50 μ L del buffer de extracción (PEX) en un tubo para microcentrífuga eppendorf de 1.5 mL. Se maceró el tejido en el tubo eppendorf usando una barra de plexiglás de laboratorio. Se le agregó 450 μ L adicionales de buffer PEX y se agitó en el vortex. El tubo con la muestra de tejido se incubó en baño maría a 65 °C durante 45 minutos. Se centrifugó la muestra durante 10 minutos a 15,000 RPM (alta velocidad) para concentrar los residuos de tejido (pellet). El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio.

Para precipitar los ácidos nucleicos se agregó 1,000 μ L de una mezcla 6:1 de etanol: acetato de amonio 7.5 M. Se mezcló invirtiendo el tubo y se dejó precipitar por 30 min a temperatura ambiente. Se agitó el tubo manualmente para romper el precipitado y se peletearon los ácidos nucleicos precipitados, centrifugando la muestra a 3,000 RPM (baja velocidad) durante 10 minutos en una microcentrífuga. Se eliminó el sobrenadante.

El tubo con el pellet se le agregó 300 μL de RNAs A (concentración de 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$) + buffer TE 0.1X (juntas), se agitó manualmente y se incubó en baño maría a 37 °C por 1 hora. La muestra se centrifugó a 15,000 RPM por 3 minutos para peletizar los residuos de tejido remanentes.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio de microcentrífuga de 1.5 mL y se precipitó el ADN agregando 1,000 μL de una mezcla 10:1 de etanol: acetato de sodio 3M. La muestra se mezcló invirtiendo manualmente el tubo y se dejó precipitando a temperatura ambiente por 10 minutos. Se agitó el tubo manualmente para romper el precipitado, antes de proceder a peletarlo. La muestra se centrifugó por 10 min a 3,000 RPM para peletizar el ADN, luego se vació el etanol/acetato de sodio y se lavó el pellet agregando 1,000 μL de etanol al 70%; se agitó manualmente. Finalmente se colectó el pellet centrifugando la muestra por 1 minuto a 14,000 RPM y se vació el etanol. Se dejó secar el pellet, invirtiendo el tubo sobre papel toalla durante 3 horas, antes de su hidratación.

Extracción de ADN. Al extraer ADN de camote, utilizando el protocolo de extracción de ADN de frijol utilizado por el Laboratorio de Biotecnología sin ninguna modificación se obtuvieron concentraciones inferiores a 10 ng/ μL (Cuadro 4), el cual es insuficiente para ser utilizado en la reacción en cadena de la polimerasa utilizando el marcador RAPD que requiere de 10 ng/ μL . Durante el desarrollo del protocolo se observó que los tiempos y revoluciones de centrifugado eran insuficientes para separar la fase sólida de la líquida o para centrifugar el sobrenadante (pellet) de la solución. También el protocolo implicaba la espera de largos periodos de tiempo o no especificaba un tiempo de espera determinado, por lo que se establecieron tiempos definidos en algunos pasos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Protocolo optimizado para extraer ADN de camote.

Pasos	Protocolo de frijol		Protocolo optimizado	
	Parámetro	Tiempo	Parámetro	Tiempo
Baño maría con PEX	65 °C	30-60 min	65 °C	45 min
Centrifugación 1	14000 RPM	10 min	15000 RPM	10 min
Precipitado con Acetato de amonio	T° ambiente	30 min	T° ambiente	30 min
Centrifugación 2	3,000 RPM	10 min	3,000 RPM	10 min
Baño maría con ARNasa	37 °C	60 min	37 °C	60 min
Centrifugación 3	14,000 RPM	1 min	15,000 RPM	3 min
Precipitado con Acetato de sodio	T° ambiente	<30 min	T° ambiente	10 min
Centrifugación 4	3,000 RPM	5 min	3,000 RPM	10 min
Centrifugación 5	14,000 RPM	15 seg	14,000 RPM	1 min

Cuadro 4. Concentraciones de ADN extraídas utilizando el protocolo utilizado en el Laboratorio de Biotecnología para la extracción de ADN en frijol.

Muestra	Concentración (ng/μL)
1	1.160
2	0.793
3	0.241
4	3.720
5	0.896
6	10.000

Material Vegetal. El protocolo de extracción de ADN en frijol utilizado en el laboratorio de Biotecnología indica que se debe tomar entre seis y ocho mitades de hojas jóvenes, sin embargo, no se considera el tamaño de las hojas. Para determinar la cantidad correcta de la muestra se tomaron dos cantidades de material vegetal: 30-40 y 60-70 mg. La cantidad de material vegetal utilizado determina la concentración de ADN extraído, sin embargo, se desconocía la presencia de algún compuesto; como los fenoles, que pudiera afectar el proceso, por lo que utilizó dos cantidades de material vegetal. Las muestras con 30-40 mg de material vegetal produjeron entre 4.09 a 98 ng/μL (Cuadro 5) con una media de 30.6 ng/μL y una desviación estándar de 19.54 ng/μL, mientras que las muestras con 60-70 mg de material vegetal produjeron concentraciones entre 10 y 93 ng/μL (Cuadro 6), con una media de 40.9 ng/μL y una desviación estándar de 23.04 ng/μL. Las muestras con mayor concentración de ADN probablemente tuvieron un alto macerado lo que puede explicar la desviación estándar. Sin embargo, el grado de maceración en cada muestra es difícilmente controlable cuando se manejan gran cantidad de muestras. Existen otros contaminantes asociados con el ADN de las plantas que causan dificultades en su extracción: compuestos polifenoles, polisacáridos y ARN (Joves *et al.* 1995). El contenido de polisacáridos, genera una solución de ADN viscoso e impuro, incapaz de amplificarse en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), debido a la inhibición de la Taq polimerasa (Fang *et al.* 1992).

Cuadro 5. Concentraciones de ADN obtenidas con muestras entre 30-40 mg de material vegetal utilizando el protocolo optimizado para extracción de ADN en camote.

No. Muestra	Concentración (ng/μL)	No. Muestra	Concentración (ng/μL)	No. Muestra	Concentración (ng/μL)
1	11	11	27	21	20
2	25	12	98	22	10
3	26	13	36	23	35
4	32	14	4.09	24	20
5	44	15	23	25	21
6	42	16	16	26	6.4
7	23	17	29	27	28
8	27	18	34	28	30
9	47	19	9.6	29	18
10	66	20	58	30	52

Cuadro 6. Concentraciones de ADN obtenidas con muestras entre 60-70 mg de material vegetal utilizando el protocolo optimizado para extracción de ADN en camote.

No. Muestra	Concentración (ng/μL)	No. Muestra	Concentración (ng/μL)	No. Muestra	Concentración (ng/μL)
1	74	11	22	21	25
2	57	12	27	22	42
3	74	13	12	23	38
4	58	14	16	24	36
5	93	15	10	25	27
6	64	16	12	26	38
7	50	17	19	27	32
8	69	18	20	28	72
9	31	19	16	29	43
10	77	20	30	30	45

Lisis celular y separación de componentes celulares. Para extraer los componentes celulares se utilizó buffer de extracción PEX; otros protocolos utilizan nitrógeno líquido y las muestras son maceradas en un mortero pre enfriado (Jarret y Austin 1994; Tel-Zur *et al.* 1999; Elameen *et al.* 2008). El objetivo principal es la ruptura de tejidos y paredes celulares para liberar los componentes celulares. Para la extracción de los componentes celulares es necesario que ocurra lisis celular, para favorecer la lisis celular las muestras son incubadas en baño maría; el protocolo utilizado en el Laboratorio de Biotecnología recomienda una temperatura de 65 °C durante 30-60 min, otros estudios reportan temperaturas de 60 °C durante el mismo rango de tiempo (Doyle y Doyle 1990; He *et al.* 1995; Villordon y LaBonte 1996), por lo que el tiempo de incubación se estandarizó a 45 min manteniendo la temperatura de 65 °C. El centrifugado también es importante para la separación de la fase sólida de la líquida, la primera prueba se realizó con 14,000 RPM tal como lo indica el protocolo utilizado por el Laboratorio de Biotecnología, sin embargo, al finalizar el tiempo de centrifugado ambas fases no estaban completamente separadas por lo que las revoluciones por minuto se incrementaron a 15,000, manteniendo el tiempo, otros autores reportan menos revoluciones de 2,000 RPM durante 10 min, pero a una temperatura de 4 °C (Wilson *et al.* 1992).

Degradación de proteínas y precipitación de ácidos nucleicos. El primer ciclo de centrifugación además de permitir la separación de la fase sólida de la líquida, también provoca una lisis celular que permite la extracción de los componentes celulares. Los ácidos nucleicos se encuentran disueltos entre los componentes celulares y para precipitarlos se utilizó una mezcla 6:1 de etanol: acetato de amonio 7.5 M. Otros protocolos utilizan un buffer de aislamiento compuesto por 50mM Tris/HCl con pH 8, 25 mM EDTA con pH 8, 0.35 mM sorbitol, 5% (PVP-40) polivinilpirrolidona, 1% de bisulfito de sodio y 0.2% de 2-mercaptoetanol (Wilson *et al.* 1992; Dabo *et al.* 1993; Villordon y LaBonte 1996). El uso de polivinilpirrolidona (PVP) es capaz de eliminar los compuestos fenólicos de la muestra; esta forma enlaces de hidrógeno con lactonas de látex, lactucina y otros compuestos fenólicos y coprecipita con los desechos celulares al momento de la lisis (Rogers y Bendich 1987; Michiels *et al.* 2003) El tiempo que el buffer de extracción está en contacto con la

solución puede determinar la cantidad de ácidos nucleicos precipitados por lo que el tiempo del primer ciclo de precipitado se mantuvo por 30 min. Finalmente, para separar los ácidos nucleicos precipitados de la solución es necesario peletearlos, centrifugando las muestras a una baja velocidad, siguiendo con el protocolo utilizado en el Laboratorio de Biotecnología se observó un adecuado pelleteado de los ácidos nucleicos, observándose una masa ligeramente viscosa adherida al tubo eppendorf, por lo que no se realizó ninguna modificación en el segundo ciclo de centrifugado. Revoluciones por minuto y tiempo de centrifugado similares son reportados por otros estudios (Wilson *et al.* 1992), mientras que otros reportan un tiempo de centrifugado de hasta 10,000 RPM durante 10 min (Tel-Zur *et al.* 1999).

Degradación de ARN y extracción de contaminantes. Un contaminante generalmente presente en preparaciones de ADN es el ARN (Rocha-Salvarrieta 2002). La degradación de esta molécula se logra por incubación con la enzima ARNasa. El tiempo de incubación con esta enzima no fue modificado, solo algunos estudios mencionan el uso de ARNasa en sus protocolos de extracción de ADN (Zhan *et al.* 2004). El tiempo del tercer ciclo de centrifugado para la eliminación de estos residuos remanentes se aumentó a 3 min para obtener muestras más limpias; tal como lo recomienda el protocolo del utilizado en el Laboratorio de Biotecnología para el cultivo de frijol. La mayoría de estudios utilizan protocolos se enfocan en la inhibición de enzimas que destruyen el ADN (ADNasas), para lograr eliminar estas enzimas utilizan solventes orgánicos (fenol y cloroformo), con antioxidantes (Dithiothreitol y B-mercaptoetanol), con agentes quelatantes (EDTA, EGTA) que capturan los iones de magnesio necesarios para la funcionalidad de las ADNasas, además de la desnaturalización por calor.

Precipitado de ADN. Después que son eliminados los lípidos y proteínas, se recupera el ADN adicionado etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio. El protocolo del Laboratorio de Biotecnología recomienda que el tiempo de precipitado no sea mayor a 30 min, por lo que el tiempo se estandarizó a 10 min y el tiempo de centrifugado aumentó de 5 a 10 min. Otros protocolos realizan la extracción de contaminantes en dos pasos; en un segundo paso precipitan el ADN utilizando tiempo de centrifugado de 20 min a 10,000 RPM a 4 °C (Tel-Zur *et al.* 1999). Finalmente, para colectar el material genético el tiempo de centrifugado se aumentó a 1 min para asegurar la formación del pellet.

Determinación de la calidad del ADN extraído. El gel de calidad mostró que las 30 muestras de ADN extraído de 60-70 mg de material vegetal mostraron bandas discretas. Una banda discreta muestra la presencia de ADN integro en la mayoría de bandas, algunas muestras (Figura 2 y 3) mostraron una leve pérdida de definición, esto indica un bajo nivel de degradación de las muestras. No se observó estelas o *smear* a lo largo de las bandas observadas.

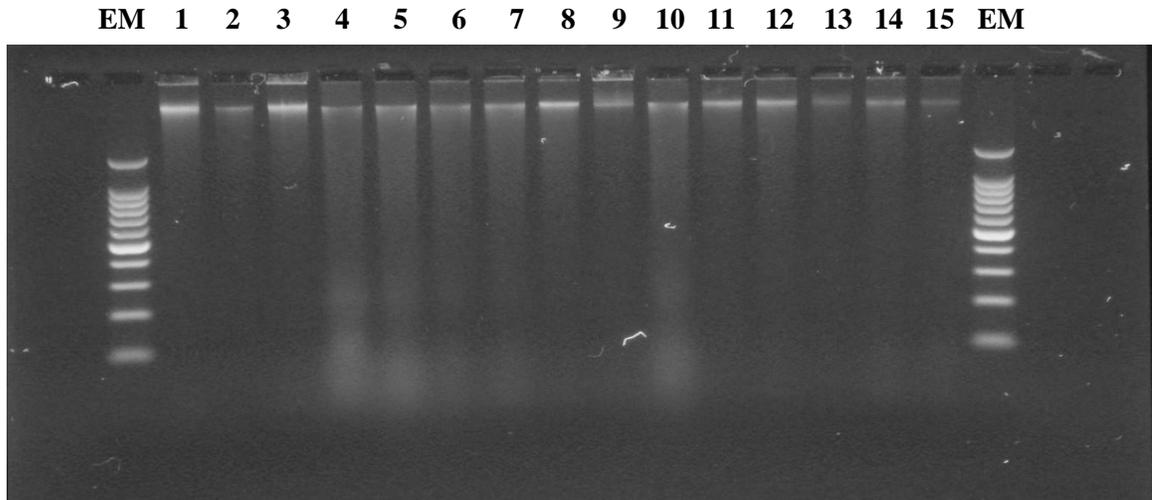


Figura 2. Gel de calidad de 15 muestras de ADN extraídas de muestras con 30-40 mg de material vegetal de camote, utilizando el protocolo optimizado.

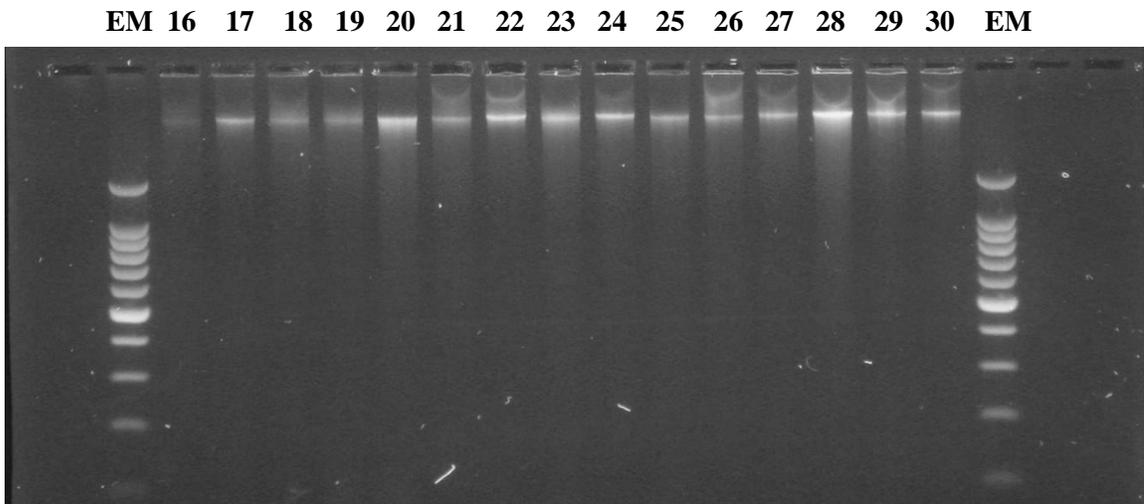


Figura 3. Gel de calidad de 15 muestras de ADN de 60-70 mg de material vegetal de material vegetal de camote, utilizando el protocolo optimizado.

Selección de cebadores RAPD para la amplificación de fragmentos de ADN en camote.

En el primer gel de electroforesis muestra bandas amplificadas entre 300 y 1000 pb, todos los marcadores fueron repetibles con excepción al OPO-05 que únicamente mostró un fragmento de la planta A. La intensidad de cada banda fue variable y no todos los fragmentos son claramente puntuables, los mejores resultados se obtuvieron con los marcadores OPR-02, OPH-20 y OPP-09, es decir las bandas 7-8, 11-12 y 15-16 respectivamente (Figura 4).

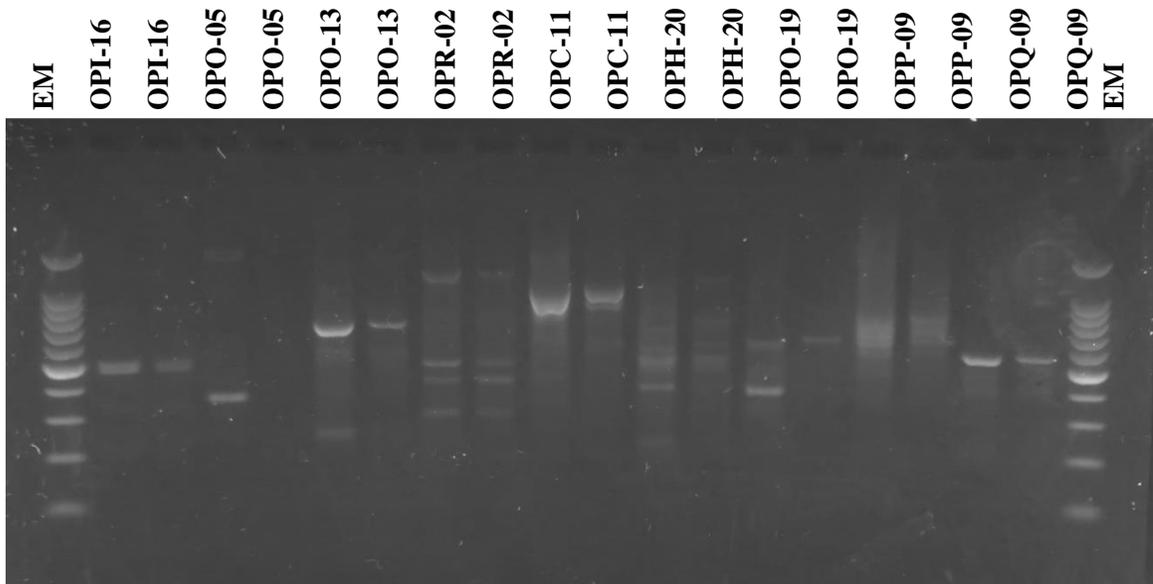


Figura 4. Productos amplificados de PCR generados por nueve cebadores en dos plántulas micropropagadas de camote.

El segundo gel de electroforesis (Figura 5) muestra bandas amplificadas entre 300 y 1000 pb, únicamente amplificaron los cebadores OPU-01, OPA-02, OPG-03, OPH-04 OPC-04 y OPT-07 pero ninguno de estos fue reproducible. Las únicas bandas con un fragmento claramente puntuable fueron las generadas por los cebadores OPG-03 y OPH-04. Todas las bandas mostraron una intensidad baja o demasiado débil, con excepción a la banda 10 que mostró un fragmento con alta intensidad.

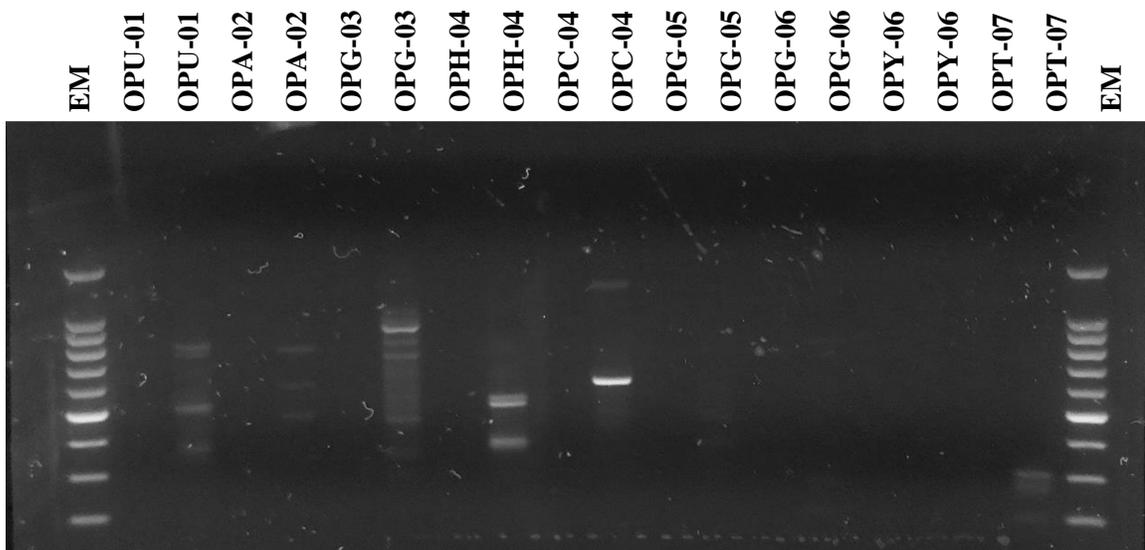


Figura 5. Productos amplificados de PCR generados por nueve cebadores en dos plántulas micropropagadas de camote.

El quinto gel de electroforesis (Figura 6) presenta bandas amplificadas entre 300 a 1000 pb, este gel presentó la menor cantidad de bandas amplificación. Los cebadores OPH-08, OPB-10 y OPW-13 mostraron bandas con una intensidad débil, sin embargo, es importante considerar que el cebador OPB-10 es el único reproducible al mostrar fragmentos en ambas plantas. El cebador OPF-03 amplificó únicamente para la planta A, mostrando fragmentos claramente puntuables y de intensidad media.

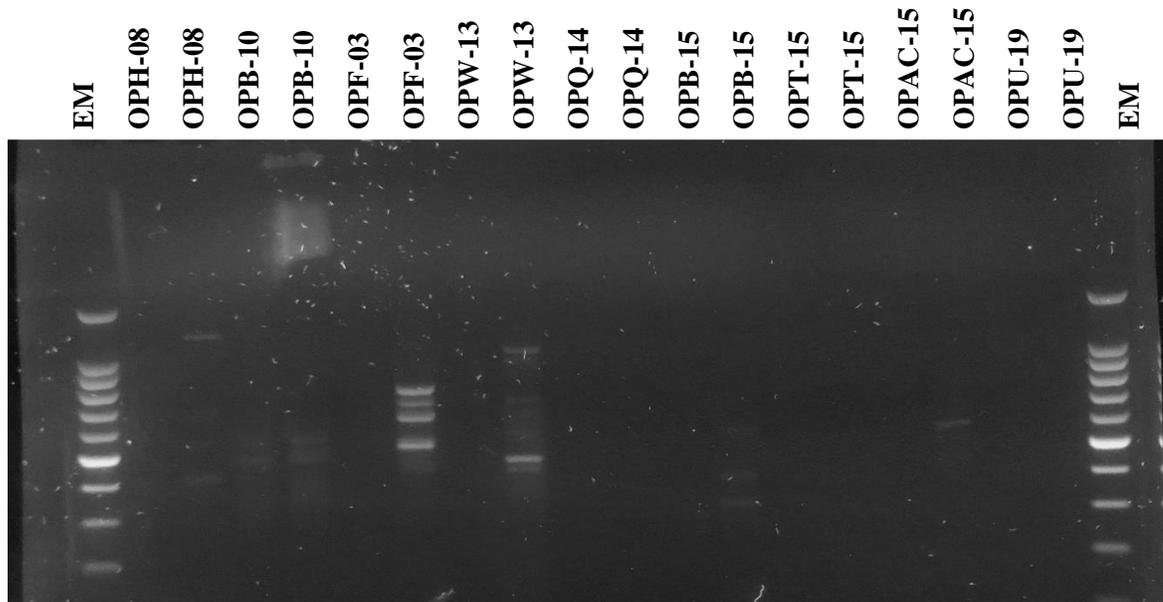


Figura 6. Productos amplificados de PCR generados por nueve cebadores en dos plántulas micropropagadas de camote.

Los últimos cebadores amplificados en el gel de electroforesis (Figura 7) mostraron el mismo patrón que las anteriores, con bandas con amplificadas entre 300 y 1000 pb, de baja intensidad y no reproducibles. Los cebadores OPD-08 y OPV-10 mostraron bandas con fragmentos claramente puntuables, pero de baja intensidad y no reproducibles.

Los marcadores RAPD han sido utilizado en numerosos estudios de variación somaclonal y algunos autores recomiendan su uso (Jarret y Austin 1994; Lin *et al.* 2009; Mahmud *et al.* 2015), por lo que se debe evaluar el uso de otros cebadores comúnmente utilizados en camote. El contraste con los resultados obtenidos se debe a que se utilizó el protocolo de amplificación de PCR para el genoma de frijol utilizado en el Laboratorio de Biotecnología. Para que las bandas sean reproducibles se debe estandarizar un protocolo de PCR específico (Velasco-Ramírez *et al.* 2014) para los cebadores RAPD para amplificar el genoma del camote.

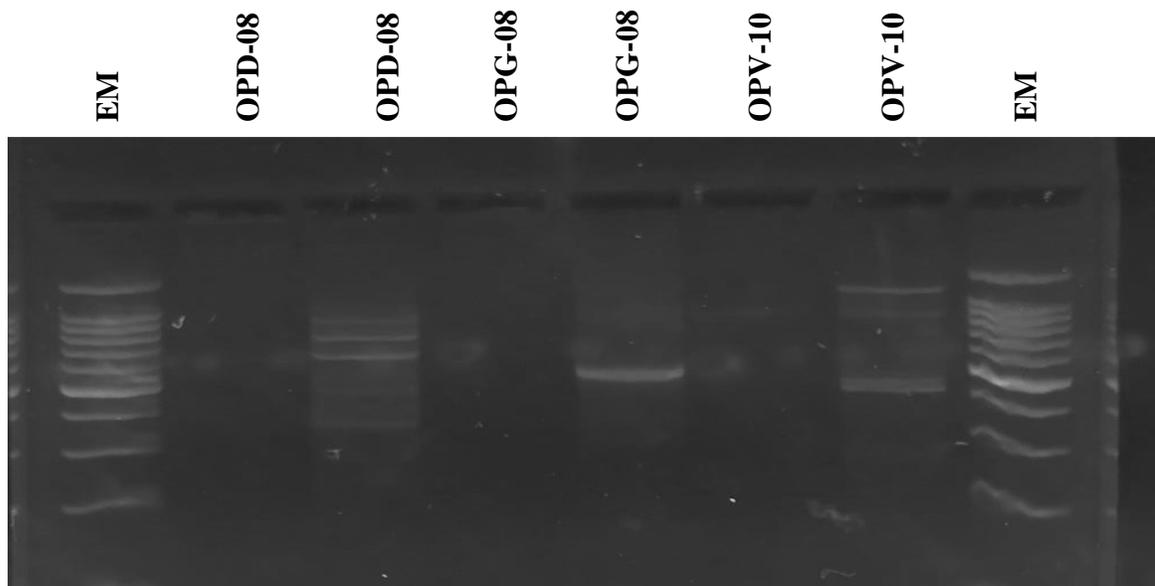


Figura 7. Productos amplificados de PCR generados por tres cebadores en dos plántulas micropropagadas de camote.

Los cebadores OPR-02, OPH-20, OPP-09, OPG-03, OPH-04, OPF-03 y OPD-08 mostraron bandas con fragmentos claramente puntuables, de alta intensidad, pero no fueron repetibles. Esto confirma que el marcador tipo RAPD es de baja repetibilidad.

Los cebadores RAPD utilizados mostraron una amplificación entre 300 y 1000 pares de bases, 6 de ellos no amplificaron, solo uno mostró bandas en ambos genotipos, y los otros 23 mostraron bandas de intensidad media-alta, con algunos fragmentos claramente puntuables. Estos resultados se deben a que los 30 cebadores utilizados son comúnmente utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN en frijol, sin embargo, algunos amplificaron en ADN de camote. Esta amplificación se debe a que los cebadores RAPD utilizan secuencias de ADN corto que le permite identificar fragmentos complementarios en el genoma, al ser fragmentos cortos existe la probabilidad de que coincidan con el genoma de diversas plantas. Por ejemplo, los cebadores OPG-03 y OPH-04 fueron utilizados en un estudio de pureza genética de plantas de palma micropropagadas *in vitro* (Kumar *et al.* 2010), en donde amplificaron seis y ocho bandas respectivamente. El cebador OPD-08 también fue utilizado en un estudio de polimorfismo de maíz (Vivodík *et al.* 2018), en donde muestra la amplificación de ocho bandas. El cebador OPC-04 también fue utilizado en un estudio de análisis de estabilidad genética en banano propagado por cultivo de tejidos (Bhalang *et al.* 2018) y otro de evaluación de variación somaclonal en papa (Munir *et al.* 2011). Los cebadores OPA-02, OPG-06 y OPG-05 fueron utilizados en un estudio de variación somaclonal en caña (Tawar *et al.* 2008).

4. CONCLUSIONES

- Se caracterizó el fenotipo típico de las plántulas de camote producidas *in vitro*.
- Se optimizó un protocolo para la extracción de ADN de plántulas de camote producidas *in vitro*, obteniendo concentraciones adecuadas y de buena calidad.
- Se observaron seis cebadores RAPD con potencial para amplificar fragmentos de ADN de camote.

5. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio de variación somaclonal de las plántulas de camote obtenidas después del cuarto subcultivo de micropropagación.
- Optimizar un protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa para los seis cebadores identificados en este estudio.
- Utilizar cebadores comúnmente utilizados para la amplificación de ADN en camote.
- Utilizar el protocolo optimizada para extracción de ADN en camote para estudios moleculares de camote.

6. LITERATURA CITADA

- Alejos-Velázquez LP, Aragón-Martínez MC, Cornejo Romero A. 2010. Estracción y putificación de ADN. En: Cornejo-Romero A, Serrato-Díaz A, Rendón-Aguilar B, Rocha-Munive MG, editores. Herramientas moleculares aplicada en ecología: aspectos teóricos y prácticos. Distrito Federal: SEMARNAT. p. 1-25.
- Aljanabi SM, Forget L, Dookun A. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide -and Polyphenol- free sugarcane DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*. 17(3):1-8. eng. doi <https://doi.org/10.1023/A:1007692929505>
- Anwar N, Kikuchi A, Watanabe KN. 2010. Assessment of somaclonal variation for salinity tolerance in sweet potato regenerated plants. *Afr. J. Biotechnol*. 9(43):7256-7265. eng. doi: <https://doi.org/10.5897/AJB09.1239>
- Arguedas P, Mora J, Sanabria J. 2015. Comparación del contenido de carotenoides en productos nutracéuticos elaborados a partir de dos variedades de camote y yuca. *Tecnología en marcha*. 28(4):43-53. esp. doi: <https://doi.org/10.18845/tm.v28i4.2442>
- Bairu MW, Aremu AO. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regul*. 63(2):147-173. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>
- Bajaj YPS, 1990. Somaclonal variation – Origin, Induction, cryopreservarion, and implications in plant breeding. En: Bajaj YPS, editor. *Biotechnology in agriculture and forestry*, volumen 11: Somaclonal variation in crop improvement I. Berlin, Heidelberg: Springer. p. 3-48.
- Bhalang D, Prabhuling G, Hipparagi K, Raghavendra S, Prakash DP, Babu AG. 2018. Analysis of the genetic stability of banana tissue culture propagated plantlets cv. Ney Poovan (AB) using morphological and molecular markets. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*. 7(1):1007-1018. eng. doi: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.701.121>
- Bhojwani SS, Dantu PK. 2013. Somaclonal variation. En: Bhojwani SS, Cantu PK, editores. *Plant tissue culture: an introductory text*. India: Springer. p. 141-154.

- Cardone S, Olmos SE, Echenique V. 2013. Variación somaclonal. En: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, editores. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Argentina: INTA. p. 229-249.
- Delgado-Paredes GE, Rojas-Idrogo C, Chanamé-Céspedes J, IS-Floh E, Handro W. 2017. Development and agronomic evaluation of *in vitro* somaclonal variation in sweet potato regenerate plants from direct organogenesis of roots. Asian J. Plant Sci. and Res. [consultado el 7 de sep de 2019] 7(1):38-48. eng. https://www.researchgate.net/publication/315793969_Development_and_agronomic_evaluation_of_in_vitro_somaclonal_variation_in_sweet_potato_plants_from_direct_organogenesis_in_roots
- Dabo SM, Mitchell ED, Melcher U. 1993. A method for the isolation of nuclear DNA from cotton (*Gossypium*) Leaves. Analytical Biochemistry. 210(1):34-38. eng. doi: <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1146>
- Dhakshanamoorthy D, Selvaraj R. 2009. Extracción of genomic DNA from *Jatropha* sp. using modified CTAB method. Rom. J. Biol. - Plant Biol. 54(2):117-125.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12(1):13-15.
- Elameen A, Fjellheim S, Larsen A, Rognli OA, Sundheim L, Msolla S, Masumba E, Mtunda K, Klemsdal SS. 2008. Analysis of genetic diversity in a sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) germplasm collection from Tanzania as revealed by AFLP. Genetic Resources and crop Evolution. 55(3):397-408. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/s10722-007-9247-0>
- Fang G, Hammar S, Grumet R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. BioTechniques. 13(1):52-56.
- Gaafar RM, Saker MM. 2006. Monitoring of cultivars identity and genetic stability in strawberry varieties grown in Egypt. World J Agric Sci. 2(1):29-36.
- He G, Prakash CS, Jarret RL. 1995. Analysis of genetic diversity in a sweetpotato (*Ipomoea batatas*) germplasm collection using DNA amplification fingerprint. Genome. 38(5):938-945. eng. doi: <https://doi.org/10.1139/g95-123>
- Jarret RL, Austin DF. 1994. Genetic diversity and systematic relationships in sweetpotato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) and related species as revealed by RAPD analysis. Genet Resour Crop Evol. 41(3):165-173. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00051633>
- John ME. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. Nucleic Acids Research. 20(9):2381. eng. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2381>

- Krishna H, Alizadeh M, Singh D, Singh U, Chauhan N, Eftekhari M, Kishan-Sadh R. 2016. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech.* 6(1):54-71. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>
- Kumar N, Modi AR, Singh AS, Gajera BB, Patel AR, Patel MP, Subhash N. 2010. Assessment of genetic fidelity of micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants by RAPD and ISSR markers assay. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 16(2):207-213. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/s12298-010-0023-9>
- Larkin PJ, Scowcroft WR. 1981. Somaclonal variation. A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoret. Appl. Genetics.* 60(4):197-214. Eng. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02342540>
- Lin KH, Lai YC, Li HC, Lo SF, Chen LFO, Lo HF. 2009. Genetic variation and its relationship to root weight in the sweet potato as revealed by RAPD analysis. *Sci Hortic.* 120(1):2-7. eng. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.09.008>
- Mahmud K, Nasiruddin KM, Hossain MA, Hassan L. 2015. Characterization of induce sugarcane somaclones and their sources varieties using random amplified polymorphic DNA. *Plant Tissue Cult. & Biotech.* 25(2):223-229. eng. doi: <https://doi.org/10.3329/ptcb.v25i2.26256>
- Mandal AB, Maiti A, Chowdhury B, Elanchezhian R. 2001. Isoenzyme markers in varietal identification of banana. *In vitro Cell Dev Biol Plant.* 37(5):599-604. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0105-z>
- Michiels A, Van-den-Ende W, Tucker M, Van-Riet L, Van-Laere A. 2003: Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry.* 315(1):85-89. eng. doi: [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00665-6](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00665-6)
- Munir F, Saqlan-Naqvi SM, Mahmood T. 2011. *In vitro* culturing and assessment of somaclonal variation of *Solanum tuberosum* var. desiree. *Turk J Biochem.* [consultado el 8 de septiembre de 2019] 36(4):296-302. eng.
- Musilová J, Bystrická J, Árvay J, Harangózo L. 2017. Poliphenols and phenolic acids in sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) roots. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences.* 11(1):82-87. eng. doi: <https://doi.org/10.5219/705>
- Rocha-Salavarrieta PJ. 2002. Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite. *Palmas.* 23(2):9-17.
- Porebski S, Grant-Bailey L, Baum BR. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter.* 15(1):8-15. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02772108>

- Pierik RLM. 1997. Somaclonal variation. En: Pierik RLM, editor. *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht: Netherlands. Kluwer Academic Publishers. p. 231-238.
- Ray T, Dutta I, Saha P, Das S, Roy SC. 2006 Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 85(1):11-21. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9044-4>
- Rodrigues PHV, Tulmann-Neto A, Cassieri-Neto P, Mendes BMJ. 1998. Influence of the number of subcultures on somaclonal variation in micropropagated nanicaõ (*Musa* spp., AAA group). *Acta Hort*. 490:469-474. eng. doi: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1998.490.49>
- Rodriguez-Enriquez J, Dickinson HG, Grant-Dowton RT. 2011. MicoRNA misregulation: an overlooked factor generating somaclonal variation? *Trends in plant science*. 15(5):242-248. eng. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.002>
- Rogers SO, Bendich AJ. 1987. Extraction of DNA from plant tissues. En: Gelvin SB, Schilperoort RA, Verma DPS, editores. *Plant Molecular Biology Manual*. Dordrecht:Springer. A6:p. 73-83. https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9_6
- Sahijram L. 2015. Somaclonal variation in micropropagated plants. En: Bahadur B, Venkat-Rajam M, Sahijram L, Krishnamurthy K, editores. *Plant biology and biotechnology*. New Delhi: Springer. p. 407-416.
- Skirvin RM. 1978. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica*. 26(1):241-266. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00039141>
- Skirvin RM, McPheeters KD, Norton M. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. *Hort science*. 29(11):1232-1237. eng. doi: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.29.11.1232>
- Tabares E, Pachón J, Roca WM. 1991. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. En: Roca WM, Mroginski LA, editores. *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones*. Cali: Centro internacional de agricultura tropical. p. 339-359.
- Tawar PN, Sawant RA, Dalvi SG, Nikam AA, KAwar PG, Devarumath RM. 2008. An assessment of somaclonal variation in micropropagated plants of sugarcane by RAPD markers. *Sugar Tech*. 10(2):124-127. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/s12355-008-0021-1>
- Tel-Zur N, Abbo S, Myslabodski D, Mizrahi Y. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from Epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Molecular Biology Reporter*. 17(3):249-254. eng. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1007656315275>

- Vázquez AM, Linacero R. 2010. Stress and somaclonal variation. En Pa E, Davey M, editores. *Plant developmental biology –Biotechnological perspectives*. Berlin: Springer. p. 45-64
- Velasco-Ramírez AP, Torres-Morán MI, Molina-Moret S, Sánchez-González JJ, Santacruz-Ruvalcaba 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 J. of Biotechnol.* 17(2):65-71. eng. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.01.002>
- Villordon AQ, LaBonte DR. 1996. Genetic variation among sweetpotatoes propagated through nodal and adventitious sprouts. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121(2):170-174. eng. doi: <https://doi.org/10.21273/JASHS.121.2.170>
- Vivodík M, Balázová Z, Gálová Z, Petrovicová L. 2018. Study of polymorphism of maize using DNA and protein markers. *Potravinárstvo Slovak journal of food sciences.* 12(1):157-165. eng. doi: <https://doi.org/10.5219/874>
- Wang Y, Wang F, Zhai H, Liu Q. 2007. Production of a useful mutant by chronic irradiation in sweetpotato. *Scientia Horticulturae.* 111(2):173-178. eng. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.10.007>
- Wilson HD, Doebley J, Duvall M. 1992. Chloroplast DNA diversity among wild and cultivated members of *Cucurbita* (Cucurbitaceae). *Theoret. Appl. Genetics.* 84(7-8):859-865. eng. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00227397>
- Zhan D, Rossel G, Kriegner A, Hijmans R. 2004. AFLP assessment of diversity in sweetpotato from Latin America and the Pacific region: Its implications on the dispersal of the crop. *Genet Resour Crop Evol.* 51(2):115-120. eng. doi: <https://doi.org/10.1023/B:GRES.0000020853.04508.a0>