

EVALUACIÓN DE FACTORES QUE INFLUENCIAN LA INDUCCIÓN,
FORMACIÓN Y DESARROLLO DE MICROTUBÉRCULOS EN ÑAME
(*Dioscorea alata* L.) var. “pico de botella”.

ROBINSON SALAZAR DÍAZ

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2002

**EVALUACIÓN DE FACTORES QUE INFLUENCIAN LA INDUCCIÓN,
FORMACIÓN Y DESARROLLO DE MICROTUBÉRCULOS EN ÑAME
(*Dioscorea alata* L.) var. “pico de botella”.**

ROBINSON SALAZAR DÍAZ

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título
de Biólogo con énfasis en Biotecnología**

Director

JAVIER DARIO BELTRAN Ph.D.

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACION Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
2002**

**Únicamente el autor es responsable de las ideas expuestas en el
presente trabajo.
(Artículo 12, Resolución 023 de 2000)**

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Sincelejo, 22 de Mayo de 2002

DEDICATORIA

A mis padres
Quienes han
proporcionado a mi y
a mis hermanos
oportunidades v

Robinson Salazar Díaz

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y amiga, gracias por la vida

A mi familia (**Libardo A., Libardo R., Yaquelin, María Irene**) gracias por saber esperar

A **HERNÁNDO GÓMEZ FRANKLIN**, Biólogo; gracias por creer en mi

A la señora **GERMANIA LARROTTA**, muchas gracias por el apoyo incondicional

A **LIBIA** del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Córdoba, gracias por las enseñanzas

A **Carlos Suárez**, Biólogo; **Merly Ardila**, Ing. Pesquero, gracias por la confianza

A los caleños gracias por mostrarnos que si se puede hacer Biotecnología en la Universidad de Sucre

A **William E. Pérez, Diargys Fernández, Samira fuentes, y Rocío Payares** gracias por haber seguido paso a paso mi trabajo y por estar siempre pendiente de él.

A la **UNIVERSIDAD DE SUCRE**

A los funcionarios, secretarias y profesores gracias por la colaboración y la paciencia

A el profesor **JAVIER DARÍO BELTRAN**, Biólogo Ph.D.; gracias por la colaboración

A la profesora **MELBA BERTEL**, Esp. Estadística; gracias por las asesorías y la paciencia

A los señores jurados: profesor **ANDRÉS ALVAREZ**, I.A.; profesor **ORLANDO NAVARRO MEJIA**, I.A.; sus comentarios y sugerencias fueron muy oportunas

A el Programa de Biotecnología Agrícola (**PBA**), Proyecto Ñame. Ministerio de Cooperación del Gobierno de Holanda (**DGIS**) - Centro de Estudios Ganaderos y Agrícolas (CEGA)

A María Elena, Estela y Etilson (LAS TESIS), gracias por no hacer simplemente su trabajo

A mis compañeros y amigos, gracias por enseñarme que llevar un libro en la mente no lo es todo en la vida, la **VIDA** es mucho más

A todas las personas que colaboraron y creyeron, su apoyo fue fundamental para la culminación exitosa de este trabajo

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN.....	15
1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3. MARCO TEÓRICO	21
3.1 MICROPROPAGACIÓN	21
3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ÑAMES.....	24
3.3 MODOS DE PROPAGACIÓN DEL ÑAME.....	28
3.3.1 Métodos convencionales.....	28
3.3.2 Biotecnologías relacionadas al cultivo de tejidos utilizadas en la propagación de ñame.	31
3.4 TUBERIZACIÓN.....	33
3.5 MICROTUBERIZACIÓN	35
4. MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1 LOCALIZACIÓN	39
4.2 CONDICIONES AMBIENTALES	39
4.3 OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL SELECCIONADO	39
4.4 OBTENCIÓN DEL BANCO DE GERMOPLASMA <i>IN VITRO</i>	40
4.5 PRODUCCIÓN DE MICROTUBÉRCULOS USANDO SEGMENTOS NODALES.....	41
5. DISEÑO Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
6.1 PRODUCCIÓN DE MICROTUBÉRCULOS USANDO SEGMENTOS NODALES.....	45
6.1.1 Experimento 1.	45
6.1.2 Experimento 2.	50
6.1.3 Experimentos 3 y 4.	54
7. CONCLUSIONES.....	61
8. RECOMENDACIONES	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
ANEXOS	70

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Enfermedades más comunes que atacan al ñame	27
Cuadro 2. Resumen de trabajos de cultivo de tejidos en Dioscorea.....	33
Cuadro 3. Efectos del fotoperíodo, concentración de sacarosa y concentración de Kinetina sobre la tuberización in vitro en cultivos de <i>D. <u>alata</u></i> L. en medio MT	42
Cuadro 4. Efectos del fotoperíodo, concentración de sacarosa y concentración de ácido abscísico sobre la tuberización in vitro en cultivos de <i>D. <u>alata</u></i> L. en medio MT.	42
Cuadro 5. Efecto del fotoperíodo, concentración de sacarosa y regulador de crecimiento (Kinetina) sobre el desarrollo de microtubérculos (MT) en cultivos de segmentos nodales de ñame <i>D. <u>alata</u></i> L. var. "Pico de Botella"	48
Cuadro 6. Efecto del fotoperíodo, concentración de sacarosa y regulador de crecimiento (ABA) sobre el desarrollo de microtubérculos (MT) en cultivos de segmentos nodales de ñame <i>D. <u>alata</u></i> L. var. "Pico de Botella"	52
Cuadro 7. Efectos principales del fotoperíodo, concentración de Sacarosa y regulador de crecimiento sobre el desarrollo de microtubérculos en cultivos de segmentos nodales de ñame <i>D. <u>alata</u></i> L. var. "Pico de Botella".	59

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Principales métodos de micropropagación. Representación esquemática de distintos materiales de partida y de los métodos que se pueden utilizar en la micropropagación.	23
Figura 2. Semilla de <i>Dioscorea</i> spp, la cual ha generado una hoja cotiledonar.....	29
Figura 3. Sección del tallo de una planta de ñame utilizada para inducir enraizamiento y posterior siembra directa a campo.	30
Figura 4. Secciones de tubérculos de ñame (<i>Dioscorea alata</i> L.) var. "Pico de Botella" de 100 g para ser plantados directamente en campo.	31
Figura 5. Vitroplanta de ñame (<i>Dioscorea alata</i> L) var. "Pico de Botella" obtenida mediante cultivo in vitro de segmentos nodales.....	32
Figura 6. Estados de diferenciación y formación de microtubérculos encontrado en cultivo in vitro de segmentos nodales ñame (<i>Dioscorea alata</i> L.) var. "Pico de Botella". a) iniciación; b) formación de microtubérculo joven; c) alargamiento distal y d) microtubérculo maduro.	46
Figura 7. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de Kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μ M) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el número de explantes que tuberizaron	47
Figura 8. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de Kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μ M) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el número de microtubérculos por explante que tuberizó	49
Figura 9. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de Kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μ M) y fotoperíodo	

(8 y 16 h) sobre el peso de microtubérculos por explante que tuberizó	49
Figura 10. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de Kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μ M) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre la biomasa total de microtubérculos por explante que tuberizó.....	50
Figura 11. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de ABA (0.0, 1.0 y 2.0 μ M) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el número de explantes que tuberizaron	51
Figura 12. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de ABA (0.0, 1.0 y 2.0 μ M) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el número de microtubérculos por explante que tuberizó	53
Figura 13. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de ABA (0.0, 1.0 y 2.0 μ M) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el peso de microtubérculos por explante que tuberizó	53
Figura 14. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de ABA (0.0, 1.5 y 2.5 μ M) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre la biomasa total de microtubérculos por explante que tuberizó	54
Figura 15. Formación de callo en cultivos de segmentos nodales de ñame (<i>Dioscorea alata</i> L.) var. "Pico de Botella" cultivados en medio MS.....	55
Figura 16. Microtubérculos cosechados y almacenados en cajas de petri con papel absorbente humedecido, correspondiente a los tratamientos 1 al 18 en el experimento 1 bajo un fotoperíodo de 8 h (a) y fotoperíodo de 16 h (b).....	56
Figura 17. Microtubérculos cosechados y almacenados en cajas de petri con papel absorbente humedecido, correspondiente a los tratamientos 1 al 18 en el experimento 2 bajo un fotoperíodo de 8 h (a) y fotoperíodo de 16 h (b).....	57
Figura 18. Formación de microtubérculos a diferentes posiciones a lo largo de la vitroplanta, a) aéreo y b) basal.....	58

LISTA DE ANEXOS

	Pag.
ANEXO A. Participación sobre la producción nacional de ñame - 1997	71
ANEXO B. Medio murashige y skoog (1962).....	72
ANEXO C. Medio de tuberización (MT)	73
ANEXO D. Analisis de varianza y comparacion multiple EXPERIMENTO 1.....	74
ANEXO E. Analisis de varianza y comparacion multiple EXPERIMENTO 2.....	81

RESUMEN

Segmentos nodales de Ñame (*Dioscorea alata* L.) variedad "Pico de Botella" fueron cultivados *in vitro* en medio de tuberización (MT) de acuerdo a Mantell y Hugo (1989) suplementado con 0.1 mg/L de Tiamina, 100 mg/L de Mioinositol, 20 mg/L de L-Cisteína, 1 g/L de Carbón Activado, 0.8% de Agar-Agar a un pH 5.8 para evaluar los efectos del fotoperíodo (8 y 16 horas), sacarosa (3 , 6 y 9 %), kinetina (0 , 1.5, 2.5 μ M), ácido abscísico (0 , 1.0 , 2.0 μ M) sobre la producción de microtubérculos. Se realizó un diseño de parcelas subdivididas organizadas en completamente al azar, los datos se analizaron mediante un ANOVA; se encontró que todos los factores evaluados tienen un efecto substancial sobre la inducción, formación y desarrollo de microtubérculos. En los tratamientos con kinetina el número más alto de microtubérculos fue obtenido bajo un fotoperíodo de 8 horas, 9% de sacarosa y 1.5 μ M de Kinetina; mientras que los microtubérculos de mayor peso fueron obtenidos generalmente a un fotoperíodo de 8 horas, 9% de sacarosa y en ausencia de kinetina. Para los tratamientos con ácido abscísico el número y peso más alto se presentó bajo un fotoperíodo de 8 horas, 6 % de sacarosa y 1.0 μ M de ácido abscísico. En estas condiciones los cultivos produjeron 235 microtubérculos con un tamaño entre 1.3 y 22.8 mm y un peso entre 2.3 y 217.4 mg. Los anteriores resultados confirman la posibilidad de producción de microtubérculos *in vitro*, con gran potencial para su evaluación como semilla comercial de ñame y como una herramienta adicional a la propagación clonal, permitiendo un mejor manejo y conservación de germoplasma de esta especie.

SUMMARY

Nodal segments of yam (*Dioscorea alata* L.) cultivars "Pico de Botella" were cultured on a tuberization medium (MT) according to Mantell and Hugo (1989) supplemented with 0.1 mg/L thiamine, 100mg/L myoinositol, 20mg/L L-cysteine, 1g/L activated charcoal, 0.8% agar at pH 5.8 to evaluate the effects of the photoperiod (8 and 16 hours), sucrosa (3, 6 and 9 %), kinetin (0, 1.5, 2.5 μ M), abscisic acid (0, 1.0, 2.0 μ M) on the production of microtubers. An experiment of split plot distributed at random was carried out. The data were analyzed by mean of an ANOVA; pointing out the evaluated that the evaluated factors have a substantial effect on the induction, formation and microtubers development. In the treatments with kinetin the highest number of microtubers was obtained under 8 hour photoperiod, 9% sucrosa and 1.5 μ M kinetin, while weightier microtubers were generally obtained at 8 hour photoperiod, 9% sucrosa and in the absence of kinetin. The higher number of microtuber and higher weight was presented for the treatments under 8 hour photoperiod, 6% sucrosa and 1.0 μ M abscisic acid. Under these treatments 235 microtubers were obtained, they showed lengths from 1.3 to 22.8 mm and weights from 2.3 to 217.4 mg. These results confirm the possibility of microtubers induction *in vitro*, which represent great potential as commercial seed for yam growers as additional tool for the clonal propagation of plants contributing to master better handling and conservation of germplasm of this cultivar.

Keywords: *Dioscorea alata*. Microtubers. Abscisic acid. Kinetin. Sucrosa. Photoperiod

INTRODUCCIÓN

Los ñames son plantas monocotiledóneas de la familia de las Dioscoreaceas la cual consta de 10 géneros y alrededor de 600 especies distribuidas en las regiones cálidas y tropicales del mundo, los ñames comestibles son todos del género *Dioscorea* (Cano y Marroquín, 1994). Estas plantas son anuales, tienen brotes de enredaderas con hojas acorazonadas, bajo tierra desarrollan el tubérculo de color café el cual puede medir hasta 1 m de largo y pesar 20 a 30 Kg. (Uwe, 1988). En algunas especies se forman tubérculos aéreos en las axilas de las hojas. El ñame es muy importante por la provisión de energía en forma de carbohidratos para millones de personas en muchos países tropicales (Mantell, 1998).

Uno de los problemas que afecta a los productores de la costa caribe colombiana es la poca disponibilidad de semilla resistente al ataque del hongo (*Colletotrichum gloeosporioides*) y virus (potyvirus, badnavirus, carlavirus, etc.), los cuales disminuyen la producción de este importante producto alimenticio (Osorio y Ramírez, 1989).

Atendiendo a esta problemática y teniendo en cuenta el papel significativo que ha tenido el ñame en la agricultura regional, se han comenzado a establecer tecnologías de producción conducidas a la obtención y distribución de material libre de patógenos.

Actualmente en Colombia se adelanta el programa regional para la producción de semilla de ñame (*Dioscorea alata*) libre de patógenos, utilizando algunas variedades de la Costa Atlántica. Este proyecto regional pertenece al programa de cooperación en Biotecnología, Holanda – Colombia. Al cual están vinculadas las

siguientes instituciones: Universidad Nacional de Colombia; Corpoica Turipaná Regional 2; Universidad de Córdoba; Universidad de Sucre y productores regionales de ñame (Buitrago, 2000).

El programa regional busca obtener semillas libres de patógenos para proveerlas a los productores y así ampliar y complementar los programas de producción de ñame en el país.

Hay reportes sobre micropropagación de algunos ñames comestibles como *D. rotundata* cv "espino" (Acosta y Beltrán, 2001); *D. alata* cv "Pico de Botella" (Rodríguez y Beltrán, 2001); embriogénesis somática en *D. alata* cv "Diamante 22" (Espitia y Quintero, 1999). Métodos los cuales han sido exitosos y en algunos casos están siendo implementados a gran escala. Sin embargo, hay algunos problemas al momento de establecer estos materiales en campo como transporte, tasa de supervivencia y personal entrenado, el cual es escaso en nuestra región.

En la Universidad de Sucre se están realizando estudios sobre la producción de microtubérculos *in vitro* como una herramienta adicional a la propagación clonal de ñame lo cual permitiría un mejor manejo del material *in vitro* para la provisión de semilla libre de patógenos.

La tuberización *in vitro* ha sido reportada en diferentes especies de Dioscorea. Entre los factores que influyen el proceso de tuberización se encuentran reguladores de crecimiento (Jean y Cappadocia, 1991; John et. al, 1993; Alhassan, 1997), concentración de sacarosa (Ng, 1988; Mantell y Hugo, 1989), suministro de nitrógeno (Mantell y Hugo, 1989; Jean y Cappadocia, 1991), fotoperíodo (Jean y Cappadocia, 1991; Ng, 1988; Mantell y Hugo, 1989; Alhassan, 1997), intensidad lumínica (John et. al, 1993) e inhibidores de crecimiento (Perea, 2000).

Aun es poca la información sobre tuberización *in vitro* en especies de Dioscorea y sobre todo en muchas de sus variedades; además, los resultados encontrados, en algunos casos son opuestos, teniendo en cuenta desde luego que en los diferentes laboratorios se ha trabajado con las variedades propias de esas regiones.

En Colombia, investigaciones preliminares sobre tuberización *in vitro* han sido realizadas en *D. alata* cv "Oso" y *D. rotundata* cv "Espino" (Perea, 2000).

En este trabajo se reportan los resultados de estudios sobre la influencia de varios factores como fotoperíodo, concentración de sacarosa y reguladores de crecimiento sobre el proceso de tuberización *in vitro* en *D. alata* L. var. "Pico de Botella" una de las variedades más productivas y económicamente importante del departamento de Sucre y de la región caribe colombiana.

1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Siendo el ñame uno de los principales productos alimenticios en la Costa Atlántica, es poca la atención que se le ha dado a este cultivo, el cuál es generalmente de subsistencia.

En Colombia el área sembrada de ñame en 1997 fue de 12.332 ha para una producción de 127.512 toneladas, teniéndose un rendimiento de 10.340 Kg/ha; para el año 1988 el área cosechada en el departamento de Sucre fue inferior en un 52.3% a la de 1997 y la producción fue 60% menor que la de 1997 (URPA,1997), anexo I.

En el año 1998 se sembraron 2.181 ha, 26.1% menos que en 1997, como consecuencia de las pérdidas (más de 70%) en las siembras del año anterior, teniendo como consecuencia la poca disponibilidad de semillas en la mayoría de los municipios. Entre los factores que han influenciado los bajos rendimientos en el departamento de Sucre estos últimos años, se encuentra la antracnosis enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum spp* y la fuerte sequía ocasionada por el fenómeno del niño; razón por lo cual se predice una gran escasez de este producto. (URPA, 1998).

Junto a estos problemas se suman las pérdidas en almacenamiento ocasionadas por factores biológicos como insectos, enfermedades y pérdidas de peso hasta de un 40% en tres meses (Plan Operativo – Corpoica, 1998), contando además con la acción negativa de otros factores físicos como humedad, luz y temperatura, lo que conlleva también a un deterioro acelerado y por ende poca disponibilidad de semilla.

La producción de microtubérculos *in vitro* puede ser una interesante alternativa para disminuir las pérdidas por los factores antes mencionados. Esta técnica permite, una vez producidos los microtubérculos, el almacenamiento y disponibilidad de gran cantidad de semillas en poco espacio y libre de agentes contaminantes o patógenos sistémicos que puedan alterar su buen desarrollo.

Los microtubérculos pueden ser almacenados bajo condiciones de obscuridad por un largo periodo de tiempo sin perder la viabilidad y luego ser transplantados y establecidos en el suelo con mínimos cuidados (Jean y Cappadocia, 1991).

Este sistema, además, podrá facilitar el intercambio de material vegetal entre los productores de la región, buscando incrementar así el desarrollo y mejoramiento de la producción de variedades promisorias seleccionadas por su resistencia o tolerancia a *Antracnosis*, su alta calidad culinaria, fácil comercialización, resistencia a sequía, alta productividad en cultivos asociados y bajos costos de producción; como es el caso de la variedad “Pico de Botella” una de las variedades económicamente importante de nuestra región sobre la cual no hay información disponible en este campo.

Este sistema podría ser desarrollado como una herramienta adicional a la propagación clonal del ñame, lo cual permitiría un mejor manejo del material *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar efectos de factores químicos y medio ambientales involucrados en la formación y desarrollo de microtubérculos en *Dioscorea alata* L. variedad "Pico de botella".

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de dos tipos de medio de cultivo sobre el crecimiento y desarrollo de microtubérculos en la variedad de ñame "Pico de Botella".
- Determinar la concentración óptima de sacarosa para la inducción de microtubérculos.
- Evaluar las concentraciones eficaces de Kinetina y ABA como promotores de la microtuberización.
- Evaluar el efecto de la duración del fotoperíodo sobre la producción de microtubérculos.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación busca el desarrollo de plántulas en un medio artificial en condiciones asépticas, a partir de explantes pequeños de plantas *in vivo* (por ejemplo: entrenudos conteniendo una yema), un medio artificial o medio de cultivo que está compuesto por: macronutrientes, micronutrientes, gelificantes y compuestos orgánicos como hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos y reguladores de crecimiento.

La propagación vegetativa tradicional comprende la multiplicación a través de la brotación, esquejes, injertos y órganos de almacenamiento, y la micropropagación se relaciona con las técnicas *in vitro* de clonación (Sondahl, 1992).

En los últimos años, la biotecnología ha suministrado técnicas que permiten lograr mejores individuos en forma más rápida, al mismo tiempo que ha hecho posible extender la capacidad de propagación clonal a especies que no eran posible propagarse por las técnicas convencionales. En esta forma se ha extendido la formación de clones de ejemplares selectos a un número de especies cultivadas.

En el avance de la biotecnología ha cumplido un papel importante el desarrollo de las técnicas del cultivo *in vitro* de células y órganos. La micropropagación, o sea la propagación clonal por cultivo *in vitro* constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de una nueva agricultura. El número de especies hortícolas, frutícolas, ornamentales, floríferas y forestales que se multiplican por alguna de las técnicas del cultivo *in vitro* es mayor (Arena y Martínez 1999).

En el área del cultivo de tejidos donde la propagación vegetativa o micropropagación han adquirido gran importancia, se han desarrollado diferentes sistemas que permiten la regeneración de plantas, entre los cuales se encuentran: (Véase figura 1)

- ◇ La multiplicación de brotes de yemas terminales, axiales o laterales. Estos se pueden obtener de los meristemos, puntas de brotes, yemas, nudos o yemas radicales.
- ◇ La organogénesis directa: a partir de un explante de un órgano se forman brotes o raíces, sin formación de callo.
- ◇ La organogénesis indirecta: a partir de la formación de un callo proveniente de un explante de un órgano, o en la parte escindida de la planta.
- ◇ Embriogénesis somática: los embriones pueden formarse directamente del explante primario, o indirectamente de las células cultivadas en una suspensión o en un medio semisólido.
- ◇ El microinjerto.
- ◇ Cultivo de embriones y esporas
- ◇ A partir de órganos de perennidad, formados en cultivos asépticos

Los objetivos de la micropropagación es la de buscar el mejoramiento de especies vegetales de importancia económica y que de acuerdo a las necesidades de cada país y de las plantas que en él se cultiven, desarrollar técnicas apropiadas y de esta forma obtener una mayor producción, mejores frutos, gran número de semillas, plantas de mayor porte y de mayor uniformidad.

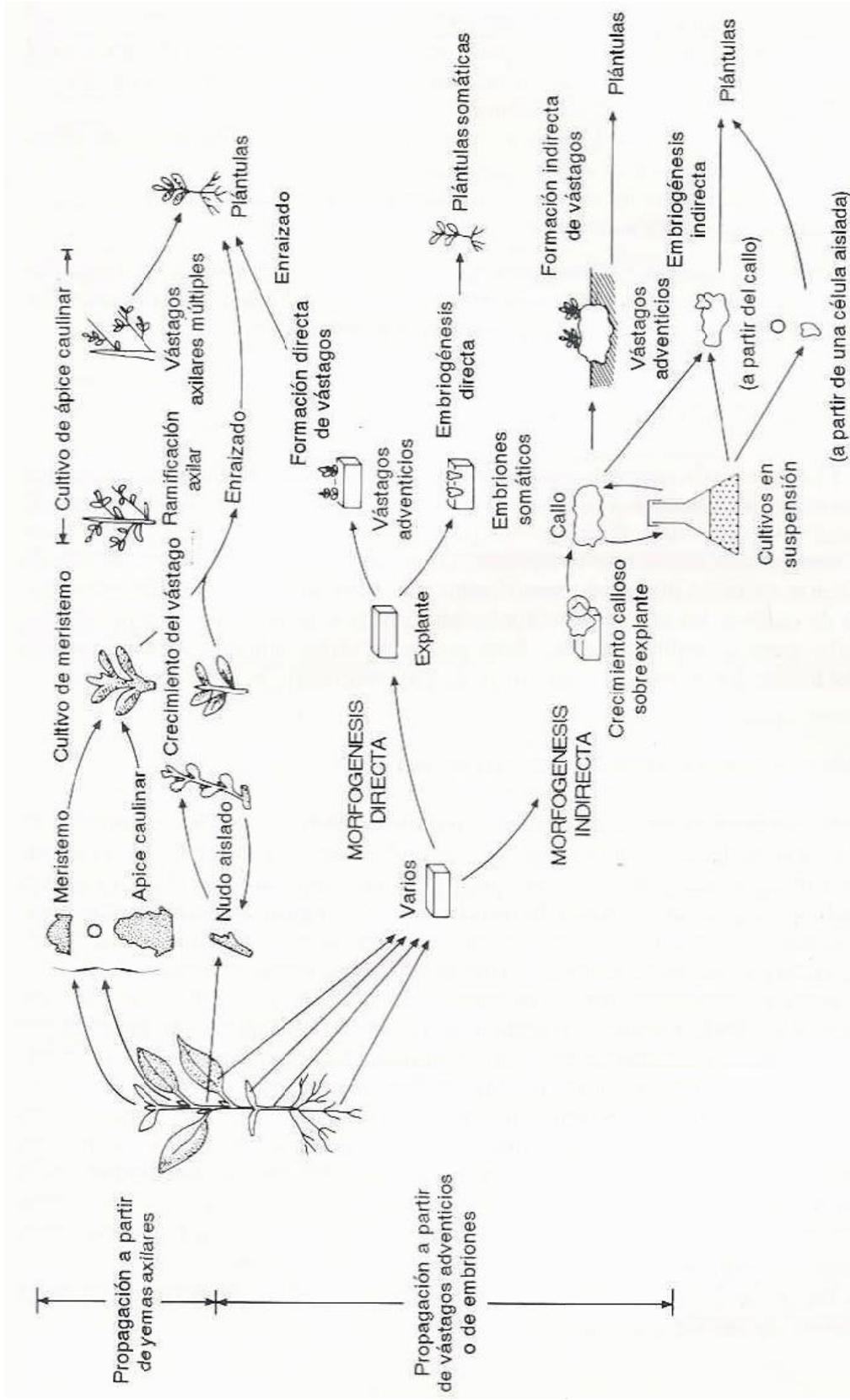


Figura 1. Principales métodos de micropropagación. Representación esquemática de distintos materiales de partida y de los métodos que se pueden utilizar en la micropropagación.

Una vez se han conseguido estos resultados, el material vegetal puede ser almacenado en bancos de germoplasma, los cuales pueden ser vueltos a utilizar en el futuro (George, 1993).

A través de la micropropagación se puede tener un enorme potencial y ciclos de corto tiempo. Esta técnica es bastante atractiva para muchas especies tropicales, las cuales tienen un alto grado de heterosis y sufren de infecciones sistémicas. Entre los cultivos económicamente importantes que están siendo utilizados en la propagación *in vitro* están: la palma de aceite, palma datilera, banano, agave, bambú, orquídeas, café, cacao, plátano, colocasia, yuca, piña, ñame y muchos otros (Sondahl et al, 1983).

La principal ventaja que posee el cultivo *in vitro* es que permite obtener ejemplares idénticos a la planta madre, lo que se conoce con el nombre de clonación.

Además, la micropropagación posee innumerables ventajas en relación a la propagación convencional dentro de las cuáles se encuentra el reducido espacio que se necesita para producir un importante número de plantas a partir de un explante sin importar la época del año para así efectuar la introducción rápida de esta especie.

La producción de plantas libres de patógenos, la propagación de plantas recalcitrantes a las técnicas convencionales y la posibilidad de conservar por tiempo prolongado germoplasma muy importante y evitar su extinción; son otras de las ventajas que ofrece el cultivo *in vitro*.

3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS ÑAMES

Los ñames pertenecen a la familia Dioscoreaceae la cual se compone de 10 géneros y alrededor de 600 especies de distribución tropical y área templado –

cálidas; (Cano y Marroquín, 1994). La familia incluye además, del género *Dioscorea*, *Stenomeris*, *Avetra*, *Trichopus*, *Rejana* y *Tamus*, Sin embargo, *Dioscorea* es el género más abundante de la familia Onwueme, 1978).

Taxonómicamente, el género *Dioscorea* está subdividido en las siguientes secciones: Enantiophylum que contiene la mayoría de las especies de ñame económicamente importantes (*rotundata*, *alata*, *cayenensis*, *opposita* y *japónica*) y es caracterizado por el hecho que las enredaderas se enrollan a la derecha en sentido de las agujas del reloj en un crecimiento hacia arriba. Las especies de la sección Lasiophyton (*dumetrorum* e *hispidá*), opsophyton (*bulbifera*), Combilium (*esculenta*) y Macriginodium (*tridá*) enrollan a la izquierda (Onwueme y Charles, 1994).

Existen cerca de 600 especies de *Dioscorea* de las cuales solamente unas cuantas son comestibles. Las especies más utilizadas comúnmente son *Dioscorea alata* L. (ñame de agua), *Dioscorea cayenensis* (ñame amarillo), *Dioscorea esculenta* [Lour] Burk (ñame común o chino) y *Dioscorea rotundata* Poir (ñame blanco). (Krikorian, 1994).

D. cayenensis y *D. rotundata* son originarias de Africa occidental mientras que *D. alata* y *D. esculenta* provienen del sur de Asia (Wydra, 1993).

Los ñames son verdaderas enredaderas caracterizadas por la presencia de tubérculos subterráneos o aéreos (Acosta, 1980); algunos pueden producir rizomas Onwueme, (1982), los cuales constituyen la parte económicamente importante y el material de propagación de la planta (Wydra, 1993; Onwueme y Charles, 1994).

Los ñames comestibles son todos del género *Dioscorea*, los cuales están ampliamente distribuidos a través de las regiones lluviosas tropicales y especialmente donde prevalecen condiciones adecuadas para su desarrollo; como

temperaturas entre 25 y 30°C, elevada humedad ambiental, buen drenaje y precipitaciones mayores de 1.500 mm y 3.000 mm por año, que permiten buenos rendimientos (Acosta, 1980; Wydra, 1993; Uwe, 1988; Ramirez et al, 1990).

El ñame es muy importante por la provisión de fuente de energía en forma de carbohidratos para millones de personas en muchos países tropicales (Mantel, 1998), los tubérculos son utilizados para preparar sopas, motes, dulces, harinas, cortisona y el follaje se usa para cataplasmas (Acosta, 1980). Las piezas de tubérculos pueden cocinarse y comidas con salsa, pueden también ser fritas, asadas o maceradas para purés y tortas (Osagie, 1992).

Se ha encontrado que varias especies entre ellas *Dioscorea composita* y *Dioscorea floribunda* son fuente de sapogeninas esteroidales como la diosgenina que es un precursor en la síntesis comercial de hormonas sexuales corticosteroides y contraceptivos orales (Ammirato, 1983; Cano, 1994; Correa y Bernal, 1992; Onwueme, 1978, Coursey, 1976).

El ñame representa un gran elemento económico en los países del oeste africano, en algunas regiones tiende a reemplazar cultivos como el maíz, la soya y el millo (Wydra, 1993)

Más de las dos terceras partes de la producción mundial de ñame proviene de Africa, estimada en 22 millones de toneladas en 2.3 millones de hectáreas (Wydra, 1993), en Colombia la producción en 1997 fue de 127.512 toneladas en 12.332 hectáreas para un rendimiento total de 10.340 Kg./ha (URPA, 1997).

Es muy importante no dejar pasar por alto que uno de los factores que más limitan la producción de ñame son las enfermedades, las cuales se pueden presentar ya sea en el campo o durante el almacenamiento.

Entre las enfermedades más comunes que atacan el ñame se encuentran las causadas por virus, nemátodos, hongos y bacterias (Cuadro 1). El cultivo también puede ser afectado por hormigas, comejenes, roedores (ratas y conejos), coleópteros, homópteros, gorgojos y gusanos (Acosta,1980).

Cuadro 1. Enfermedades más comunes que atacan al ñame

Agentes	Enfermedad	Referencia
Hongos		
Fusarium oxysporum	Marchitez	Osorio y Ramirez, 1989; Ng, 1992; Acosta, 1980
Phyllosticta sp	Mancha phyllosticta	Osorio y Ramirez, 1989
Cercospora sp	Cercosporiosis	Acosta, 1980
Rhizoctonia solani	Mancha zonificada	Acosta, 1980
Curvularia sp	Mancha de curvularia	Osorio y Ramirez, 1989
Sclerotium rolfsii	Mancha anillada	Osorio y Ramírez, 1989
Colletotrichum sp	Tizón	Acosta, 1980
Phylacora sp	Manchas de alquitrán	Acosta, 1980
Colletotrichum gloeosporioides	Antracnosis	Osorio y Ramirez, 1989; Moura-Costa,1993
Aspergillus spp	Yam storage rot	Ng, 1992
Bacterias		
Erwinia carotovora	Yam bacterial rot	Ng, 1992
Nemátodos		
Meloidogyne spp	Root – knot nemátodo	Ng, 1992; Acosta, 1980
Scutellonema bradys	Yam nemátodo	Ng, 1992; Acosta, 1980
Pratylenchus coffeae	Lesion nemátodo	Ng, 1992; Acosta, 1992
Ratas y conejos	Daño al tubérculo durante el almacenamiento.	Acosta, 1980
Heteroligus meles	Daño al tubérculo durante el almacenamiento.	Acosta, 1980
Aspideela Hortti	Daño a tubérculo durante el almacenamiento.	Acosta, 1980
Virus		
Potyvirus. (Yam Mosaic Virus)	Mosaicos	Thouvenel et al, 1979
Heteroligus spp Araecerus fasciculatus Crioceris lividaxlema	Yam beetles	Osagie, 1992

3.3 MODOS DE PROPAGACIÓN DEL ÑAME

3.3.1 Métodos convencionales

Propagación por semillas. En nuestro medio la gran mayoría de las variedades conocidas no florecen y las que logran hacerlo son completamente estériles no llegando a producir por lo tanto frutos ni semillas. De la mayoría de especies de ñame; solamente *D. dumetorum*, *D. bulbífera* y *D. trifida* florecen y producen semillas regularmente (Onwueme, 1978) Las tres especies comercialmente importantes de ñame tienen floración irregular. *D. cayenensis* produce solamente flores masculinas y no puede producir semillas. *D. alata* muy raramente produce flores y semillas bajo cultivo. Para *D. rotundata*, un amplio rango de comportamiento de floración y producción de semilla existe y, aparentemente, el modelo exacto de este comportamiento depende de la variedad.

Las semillas sexuales de Dioscorea tienen un periodo de latencia que puede durar varias semanas y su germinación tiende a ser irregular y escasa. Tratamientos de pregerminación no deben ser usados debido a que pueden ser dañinos, Tan pronto las plántulas tengan la primera hoja se debe colocar un soporte para que crezcan, cuando tenga dos hojas debe ser transplantadas a tarros o potes, luego son llevadas a campo especialmente en período lluvioso colocándolas bajo sombra (Acosta, 1980).

Las semillas pueden ser colocadas en papel filtro húmedo o en suelo contenido en potes. La nueva plántula parece consistir enteramente de una hoja (hoja cotiledonar) con un largo peciolo. En este estado, el punto de crecimiento es una estructura muy pequeña que parece ocupar una posición en la base del peciolo; este punto de crecimiento permanece pequeño y sin elongar hasta cerca de tres semanas después de la germinación, (véase figura 2).

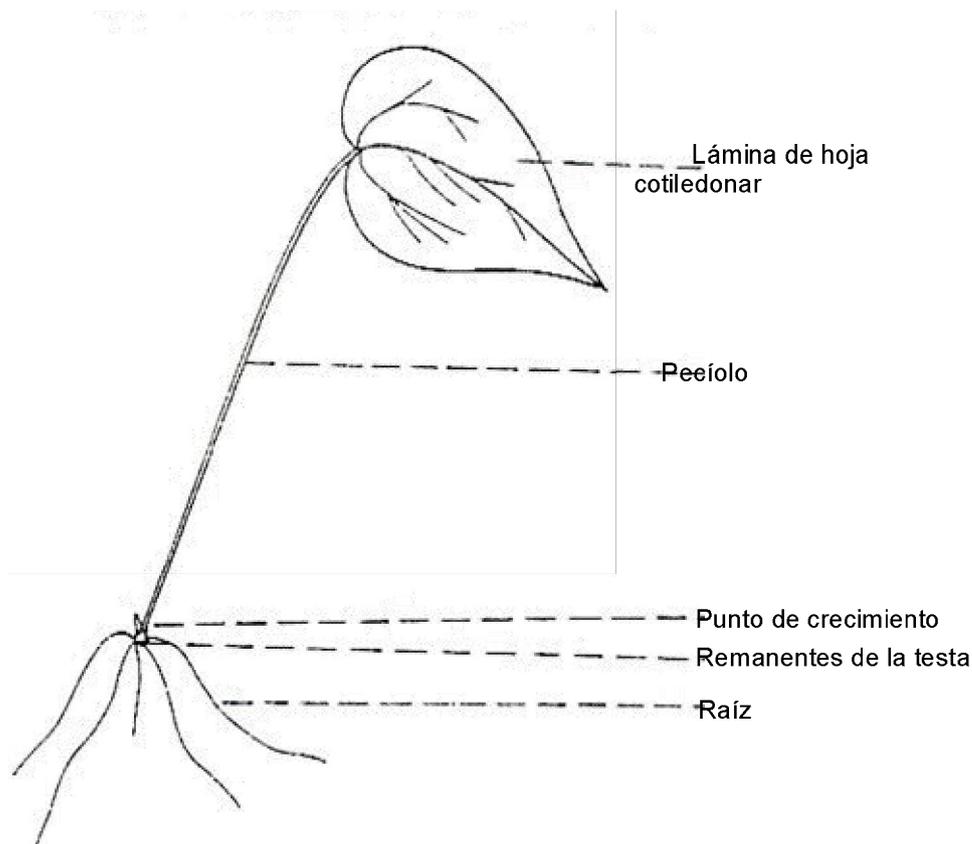


Figura 2. Semilla de Dioscorea spp, la cual ha generado una hoja cotiledonar

Propagación por secciones de tallos. El método esencialmente implica tomar una pieza de tallo de ñame, inducirlo a enraizar en agua o en una mezcla de substrato y poner a crecer la planta establecida para madurar, ocasionalmente, se ha obtenido enraizamiento al plantar directamente al suelo la sección de tallo (Onwueme,1978). (Véase figura 3). Este sistema no tiene mucho valor comercial y no es muy utilizado en nuestro medio, se utiliza casi exclusivamente para fines de mejoramiento genético cuando se quieren conservar y mantener características especiales bajo estudios rigurosos de selección (Acosta,1980). La propagación por este medio permite producir plantas que podrían estar libres de ciertas enfermedades, como nemátodos, los cuales son normalmente transmitidas por propagación del tubérculo.



Figura 3. Sección del tallo de una planta de ñame utilizada para inducir enraizamiento y posterior siembra directa a campo.

Propagación por bulbos y tubérculos. La propagación por bulbos tienen ciertas características similares a la propagación por tubérculos, el bulbo exhibe dormancia, hay una región en la cabeza en la cual la germinación ocurre preferencialmente y el tamaño de la producción es influenciado por el tamaño del bulbo utilizado para la plantación. Un bulbo intacto en almacenamiento o después de plantado germinará en la región de la cabeza cerca de el punto donde este estaba originalmente unido al tallo, sin embargo, si el bulbo es cortado en varias piezas antes de plantar, la pieza de la cabeza germinará rápidamente, mientras que las otras piezas necesitarán más tiempo para diferenciar las yemas de el meristemo a la corteza.

Tubérculos enteros pueden ser usados, debido a que la cantidad de las yemas es mayor y además en casos de extrema sequía, este material se puede conservar mejor bajo el suelo debido a que demora mucho más tiempo para descomponerse.

Cuando la semilla es escasa, se acostumbra utilizar para la siembra pedazos de tubérculos (véase figura 4), los cuales deben provenir de plantas sanas y vigorosas; en términos generales el peso o tamaño de los pedazos de ñame varía

de acuerdo a la variedad y las condiciones reinantes. Los tubérculos para la propagación deben escogerse cuando están en completa latencia, osea, cuando todas las partes vegetativas hayan cesado por completo, los no maduros del todo son más susceptibles a daños mecánicos y enfermedades.



Figura 4. Secciones de tubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella" de 100 g para ser plantados directamente en campo.

3.3.2 Biotecnologías relacionadas al cultivo de tejidos utilizadas en la propagación de ñame.

Propagación por cultivo de tejidos. La propagación de ñame por cultivo de tejidos data de 1958, con los experimentos realizados por Sawada, esta tecnología ha sido bien desarrollada en la eliminación de enfermedades y multiplicación rápida, usando meristemos y segmentos nodales; es posible regenerar plantas de pecíolo, tallo, hoja y tejido de tubérculos a través de regeneración directa de plantas o vía formación de callos y cultivos en suspensión. Otros métodos de cultivo como embriones y cultivo de protoplastos también

han sido reportados, recientemente, la producción *in vitro* de microtubérculos se ha propuesto como una herramienta adicional para la propagación de esta especie tal y como se describe para papa y batata. En el cuadro 2 se puede observar un resumen de los trabajos realizados en ñame. En la figura 5 se observa una planta de ñame *D. alata* L. var. "Pico de Botella" obtenida mediante cultivo *in vitro* de segmentos nodales.



Figura 5. Vitroplanta de ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella" obtenida mediante cultivo *in vitro* de segmentos nodales.

Cuadro 2. Resumen de trabajos de cultivo de tejidos en Dioscorea.

Especie	Explante	Regeneración / Estudio	Referencia
<i>D. cayenensis</i> <i>D. trifida</i>	Segmento nodal	Plantas	Mitchel et.al,1995
<i>D. cayenensis</i> <i>D. trifida</i> <i>D. rotundata</i>	Tubérculos Meristemos Tallos	Plantas	Mitchel et.al,1995
<i>D. abyssinica</i> <i>D. mangelotiana</i>	Segmentos nodales	Plantas	Lauzer et.al,1992
<i>D. opposita</i>	Segmentos nodales	Regeneración de callos embriogénicos	Nagasawa y Finer, 1989
<i>D. bulbifera</i>	Segmentos nodales	Plantas	Forsyth y Staden, 1982
<i>D. rotundata</i>	Segmento nodal	Plantas	Mantell et.al, 1978
<i>D. alata</i>	Puntas meristemáticas	Plantas	mantell et.al, 1980
<i>D. abyssinica</i> <i>D. mangelotiana</i>	Segmento nodal	Plantas Citología	Lauzer et.al,1992
<i>D. alata</i>	cultivo en suspensión	Transformación	Tör et.al,1993
<i>Dioscorea ssp</i>	Segmento nodal	Transformación	Tör et.al,1992
<i>D. alata</i>	Embrión somático Raíces	Plantas	Twyford y Mantell,1996
<i>D. alata</i>	Diferentes explantes	Embriogénesis somática -Plantas	Espitia y quintero, 1999
<i>D. alata</i> <i>D. rotundata</i>	Segmento nodal	Microtuberización	Perea, 2000
<i>D. alata</i>	Segmento nodal	Plantas	Acosta y Beltrán, 2001
<i>D. alata</i>	Segmento nodal	Plantas	Rodríguez y Beltrán, 2001

3.4 TUBERIZACIÓN

La tuberización es un complejo fenómeno que es influenciado por una serie de variables como nutrición, ambiente, tubérculo madre, genética y área foliar entre otros.

Existen dos teorías sobre el proceso de tuberización:

- ◆ *Teoría nutricional.* Investigaciones en esta área atribuyen el proceso de formación de tubérculos a la existencia de carbohidratos excedentes. En 1918 Kraus y Kraybill estudiando cambios en la proporción carbono : nitrógeno con relación al crecimiento de plantas de tomate establecieron la teoría nutricional. En 1923 Wellinsiek aplicó esta teoría al proceso de tuberización.

- ◆ *Teoría hormonal.* Hoy se cree que sustancias de crecimiento de las plantas son responsables para la iniciación en el proceso de tuberización que causa una acumulación de carbohidratos en los tubérculos. En 1954 Gregory suministró evidencia experimental que sustentaba la teoría hormonal de la tuberización, demostró que una sustancia específica era encontrada en la formación de tubérculos producida bajo ciertas condiciones ambientales y ésta no era un metabolito muy importante, tal como un carbohidrato.

La teoría hormonal de la tuberización explica que dos factores afectan el proceso en una forma secuencial, primero hay cambios en factores ambientales (fotoperíodo y temperatura), los cuales provocan cambios endógenos en sustancias de crecimiento de las plantas. Las evidencias experimentales para la teoría hormonal de la tuberización pueden ser divididas en 2 categorías:

- Niveles endógenos de sustancias de crecimiento de las plantas.
 - Aplicaciones exógenas de sustancias de crecimiento.
- (Arteca, 1995).

Aunque hay una considerable cantidad de investigaciones en el área de tuberización, el proceso por el que los tubérculos son formados permanece poco claro. Es conocido que factores ambientales como temperatura y fotoperíodo provocan cambios en los niveles endógenos de las sustancias de crecimiento de las plantas que están implicadas en el proceso de tuberización, sin embargo con la excepción de las giberelinas, que han demostrado inhibir el proceso, se conoce poco acerca del papel de las sustancias de crecimiento de las plantas en la

tuberización. Aún en la actualidad investigaciones a nivel molecular no han arrojado mucha luz sobre una mejor comprensión del papel de los reguladores de crecimiento de las plantas sobre el proceso de tuberización.

La serie de eventos que permiten la iniciación del tubérculo y su subsecuente crecimiento de los tubérculos de ñame son las siguientes:

El primer evento en la formación de la mayoría de los ñames es el comienzo de la actividad meristemática en la unión del tallo y la raíz (región del hipocótilo). Esta actividad resulta en la producción de una masa amorfa de células, las cuales son usualmente blancas pero pueden ser pigmentadas en algunas variedades de *D. alata*. Esta masa de células pronto organiza un punto de crecimiento y la estructura comienza a elongar. En este estadio, el órgano puede ser distinguido como un tubérculo joven. El merístemo primario permanece en la punta de crecimiento del tubérculo joven, el cual es distal a el punto de unión al hipocótilo. Una vez se ha establecido la polaridad, este merístemo continua la división y produce más células; las células producidas se agrandan y en un tiempo se llenan de almidón. El incremento en el tamaño del tubérculo es por lo tanto debido a la producción de nuevas células por el merístema primario y su subsecuente agrandamiento.

3.5 MICROTUBERIZACIÓN

Bajo condiciones ambientales apropiadas, las plantas que naturalmente desarrollan tubérculos, pueden ser inducidas a producir versiones en miniatura de estos órganos de almacenamiento, en un medio que contenga altos niveles de citoquinina. Los tubérculos normalmente formados bajo tierra son producidos *in vitro* en las posiciones de los brotes axilares de plantas micropropagadas. Dos tipos de cultivos donde los microtubérculos han sido utilizados para la propagación han sido papa y ñame. Los métodos para la inducción de tuberización *in vitro* de papas fue primero descrito por diferentes autores como lo reporta George, (1993).

El fenómeno de tuberización *in vitro* de ñame fue observado en *Dioscorea bulbifera* por Uduebo en 1971, Ammirato en 1976 y 1984, Forsyth y Van Staden en 1984; en *Dioscorea alata* por Ammirato en 1976 y 1984, Ng en 1986; en *D. rotundata* por Ng en 1986 y 1988 usando segmentos nodales como explantes (Ng, 1992).

Estudios sobre los efectos de hormonas sobre la tuberización *in vitro* de *D. alata* y *D. bulbifera* realizado por Ammirato en 1976 demuestran que ANA o ABA estimulan la formación de tubérculos, GA3 promueve el crecimiento del vástago y una combinación de zeatina y ANA estimula la formación de tubérculos.

Ng, (1988) reporta que la tuberización ocurre principalmente en la base del tallo, aunque también se pueden desarrollar tubérculos aéreos, los cuales son obtenidos ocasionalmente y su formación se da a nivel de nudos.

Ng, (1988) cultivó segmentos nodales de ñame (*D. rotundata*) sobre medio MS suplementado con varias concentraciones de sacarosa, 20 mg/L de cisteína y 0.5 mg/L de Kinetina; encontrando que bajo un fotoperíodo de 12 y 16 horas, la frecuencia de tuberización fue más alta a 5 % de sacarosa y declinó a una concentración más baja o más alta, aunque a un fotoperíodo de 24 horas la frecuencia más alta fue a 8 % de sacarosa.

Mantell y Hugo, (1989) encontraron que la mayor frecuencia de tuberización en cultivos de *D. alata* ocurrió en un medio MT suplementado con 2 % de sacarosa, 2.5 μ M de Kinetina bajo un fotoperíodo de 8 horas a 25 °C, mientras que en *D. bulbifera* la tuberización ocurrió en MS suplementado con 4 % de sacarosa, 2.5 μ M de Kinetina bajo un fotoperíodo de 8 horas a 25 °C.

En los trabajos realizados por Jean y Cappadocia, (1991) se observa que el mayor número de microtubérculos *in vitro* en cultivos de *D. alata* y *D. abyssinica* se

presentó bajo fotoperíodos de 16 y 24 horas, mientras que los más grandes generalmente fueron obtenidos bajo un fotoperíodo de 8 horas. Una evaluación de la concentración de ANA sobre el proceso de tuberización in vitro en los mismos cultivos de *Dioscorea*, realizado en 1992, bajo un fotoperíodo de 8 horas, arrojó en *D. alata* a una concentración de 27 y 54 μM de ANA un incremento en el tamaño y en la biomasa total bajo estas concentraciones, para *D. abyssinica* estas variables tuvieron un óptimo a una concentración de 2.7 μM de ANA.

John et al (1993) evaluaron el efecto de reguladores de crecimiento, intensidad de luz y calidad de luz sobre la inducción (porcentaje de cultivos con microtubérculos) y desarrollo (peso fresco de microtubérculos) de microtubérculos en cultivos de *D. alata*. El ABA estimuló el desarrollo de MT en cultivos de segmentos nodales de *D. alata* en medio de tuberización bajo un fotoperíodo de 8 horas. Una concentración de 2.5 μM de Kinetina inhibió el desarrollo de MT bajo estas mismas condiciones.

Alhassan , (1998) suplementó el medio MT con 1.0 μM de Kinetina el cual mejoró substancialmente la frecuencia de tuberización en cultivos de *D. alata*, también evaluó niveles de Kinetina con un set de nivel de 1.0 μM de ABA, lo cual redujo la frecuencia de tuberización. La incubación de los cultivos bajo fotoperíodo de 16 horas por 7-21 días previo a la incubación bajo 8 horas aumentó la frecuencia de inducción de microtubérculos drásticamente.

Los tubérculos en miniatura tienen la gran ventaja que ellos pueden ser removidos fácilmente de los frascos de cultivo en condiciones de dormancia y almacenados *ex vitro*; cuando son plantados en el suelo, ellos se comportan como tubérculos normales y producen plantas de brotes axilares. El papel importante de los microtubérculos en la distribución internacional de material vegetal libre de virus no puede ser pasado por alto si son producidos de brotes libres de virus. Los minitubérculos proveen un método ideal de propagación y distribución de material libre de virus a los agricultores (Ng, 1988; John, 1993; Mantell y Hugo, 1989).

Estos pueden ser empacados en recipientes estériles cubiertos en algodón o papel filtro húmedo para distribución internacional, tienen un gran potencial para el almacenamiento y distribución de germoplasma élite del género (Krikorian, 1994); las ventajas de usar microtubérculos para el intercambio internacional de germoplasma son:

- Ellos pueden ser producidos de plantas libres de virus, así el peligro de distribuir o introducir enfermedades es disminuido.
- Pueden ser mantenidos bajo condiciones de obscuridad por largo periodo de tiempo sin pérdida de viabilidad, así se facilita el envío por correo.
- Pueden ser fácilmente transplantados y establecidos en el suelo con mínimos cuidados.

El sistema de producción de microtubérculos *in vitro* no solo provee microtubérculos para almacenar, plantar o distribuir, sino que al mismo tiempo los brotes pueden también ser usados para futura multiplicación. Así se incrementa la rata total de multiplicación (Ng, 1992)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LOCALIZACIÓN

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, la cual está localizada a los 9° 9' de latitud norte y a los 75° 27' de longitud oeste de Greenwich. Presenta una Humedad relativa promedio de 77%, una precipitación anual de 1078,5 mm, altitud de 200 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 28°C.

4.2 CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales del laboratorio fueron:

Temperatura: 29-31 °C

Humedad relativa: 40-50 %

Intensidad lumínica: 40-45 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ (PAR: radiación fotosintéticamente activa)

4.3 OBTENCIÓN Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL SELECCIONADO

Tubérculos de *D. alata* L. var. "Pico de Botella" fueron suministrados por el banco de germoplasma de la Universidad de Córdoba, Montería-Córdoba. Piezas de tubérculos de 100 g fueron lavados con detergente y enjuagados con agua destilada estéril, luego fueron colocados en una solución fungicida (Benlate 2 g/L) durante media hora; estas piezas fueron dejadas sobre papel (Kraf) hasta que se

produjo la cicatrización de los cortes (5-7 días aproximadamente). Luego fueron sembrados en una mezcla de sustrato en proporción (1:1:1); compuesto por arena, cascarilla de arroz y tierra negra(la cual presenta un buen contenido de materia orgánica) previamente esterilizados en autoclave a 121 °C y 1.5 Kg./cm² durante 20 minutos. Este sustrato fue utilizado debido a que favoreció la brotación de las piezas de tubérculos en previos experimentos.

El material fue almacenado en casa malla, la nutrición se realizó con sales de Murashige y Skoog (MS) cada 2 semanas y riego con agua de la llave cada tres días, aplicando riego directamente sobre el sustrato.

4.4 OBTENCIÓN DEL BANCO DE GERMOPLASMA *IN VITRO*

Segmentos nodales de aproximadamente 3 cm de longitud fueron tomados de plantas de 4-5 meses de desarrollo, fueron tratados con etanol al 70% durante 30 s., luego lavados con detergente por 5 min. y enjuagados tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente y en laboratorio fueron desinfectados en cabina de flujo laminar con etanol al 70% durante 30 s. y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, luego se utilizó peróxido de Hidrógeno al 2% durante 2 min. y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril. Finalmente fueron tratados con Hipoclorito de Sodio al 2% durante 10 min. y enjuagados tres veces con agua destilada estéril.

Segmentos individuales de aproximadamente 1 cm. de longitud fueron colocados sobre un medio de iniciación con sales MS suplementado con 30 g/L de sacarosa, 0.1 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mioinositol, 20 mg/L de L-cisteína, 1 g/L de carbón activado, 0.1 mg./L de BAP, 8 g/L de Agar-Agar y pH 5.7-5.8. El medio fue servido en frascos de vidrio, tapados con papel aluminio y esterilizados en autoclave a 121 °C y 1.5 Kg/cm² por 20 min., los cultivos fueron incubados a una temperatura de 29±2 °C bajo una intensidad lumínica de 45 μmol m²S⁻¹ (Lámparas

fluorescentes Silvania, 40 W) y un fotoperíodo de 12 horas luz. Estos fueron multiplicados utilizando subcultivos regulares cada 30 días; el medio basal y las condiciones usadas fueron los mismos descritos anteriormente; excepto que los reguladores de crecimiento utilizados fueron: 0.5 mg/L de ANA y 4.0 mg/L de BAP acorde a la metodología descrita por Rodríguez y Beltrán (2001).

4.5 PRODUCCIÓN DE MICROTUBÉRCULOS USANDO SEGMENTOS NODALES

Vitroplantas de 5-6 meses de edad con 8-10 segmentos nodales cada una fueron seccionadas en segmentos individuales de 1 cm con una hoja e inducidos a tuberizar en medio basal MS y medio de tuberización - MT (Mantell y Hugo, 1989) suplementados con 0.1 mg/L de tiamina, 100 mg/L de mioinositol, 20 mg/L de L-cisteína, 1 g/L de carbón activado, 0.8% de Agar-Agar y un pH 5.8, los medios fueron esterilizados en erlenmeyer de 500 mL como se describió anteriormente, luego se adicionaron los reguladores de crecimiento los cuales fueron previamente filtrados en Millipore de 2 μ ; finalmente el medio fue dispensado en volúmenes de 20 mL en frascos de vidrio (120 mL de capacidad) previamente esterilizados.

Un segmento nodal fue colocado por cada frasco de cultivo y se incubaron bajo las siguientes condiciones: Humedad relativa 40 - 50%, la temperatura se mantuvo entre un rango de 29-31 °C, la intensidad lumínica en un gradiente de 40- 45 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ y dos fotoperíodos de 8 y 16 horas luz. Adicionalmente se evaluaron los efectos del fotoperíodo simultáneamente con diferentes concentraciones de sacarosa (30, 60 y 90 g/L), Kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μM) y ácido abscísico (0.0, 1.0 y 2.0 μM). Véase cuadros 3 y 4.

EXPERIMENTO 1

Cuadro 3. Efectos del fotoperíodo, concentración de sacarosa y concentración de Kinetina sobre la tuberización in vitro en cultivos de *D. alata* L. en medio MT.

Fotoperíodo	Sacarosa [g/L]	Kinetina [μ M]
8	30	0.0
		1.5
		2.5
	60	0.0
		1.5
		2.5
	90	0.0
		1.5
		2.5
16	30	0.0
		1.5
		2.5
	60	0.0
		1.5
		2.5
	90	0.0
		1.5
		2.5

EXPERIMENTO 2

Cuadro 4: Efectos del fotoperíodo, concentración de sacarosa y concentración de ácido abscísico sobre la tuberización in vitro en cultivos de *D. alata* L. en medio MT.

Fotoperíodo	Sacarosa [g/L]	ABA [μ M]
8	30	0.0
		1.0
		2.0
	60	0.0
		1.0
		2.0
	90	0.0
		1.0
		2.0
16	30	0.0
		1.0
		2.0
	60	0.0
		1.0
		2.0
	90	0.0
		1.0
		2.0

En los experimentos 3 y 4 se evaluaron los mismos factores, solo que el medio MT fue reemplazado por el MS, los demás suplementos no fueron variados.

Datos sobre el número de explantes que tuberizaron, número promedio de microtubérculos por explante, peso promedio y biomasa total de microtubérculos fueron registrados después de 24 semanas de incubación. Los microtubérculos cosechados fueron pesados, medidos (largo y diámetro) y almacenados en cajas de petri con papel absorbente humedecido.

5. DISEÑO Y ANALISIS ESTADISTICO

Se realizó un diseño de parcelas subdivididas organizadas en completamente al azar, donde las parcelas principales fueron el fotoperíodo (8 y 16 h) las subparcelas nivel de sacarosa (30, 60 y 90 g/L) y las subsubparcelas (Experimento 1 y 3: 0.0, 1.5 y 2.5 μM de Kinetina; Experimento 2 y 4: 0.0, 1.0 y 2.0 μM de ABA).

La unidad experimental correspondió a un explante por frasco de cultivo. Cada combinación de fotoperíodo x sacarosa x (Kin. o ABA) tuvo 10 repeticiones, para un total de 180 unidades experimentales.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante un ANOVA y para la separación de medias se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuatro experimentos fueron realizados para evaluar el efecto de varios componentes del cultivo de tejidos vegetales conocidos por influenciar la inducción, formación y desarrollo de microtubérculos *in vitro* en aquellas especies que producen tubérculos entre las cuales se encuentran las Dioscoreas como el ñame.

6.1 PRODUCCIÓN DE MICROTUBÉRCULOS USANDO SEGMENTOS NODALES

A las pocas semanas de incubación se observó en los cultivos que presentaron tuberización la formación de una masa indiferenciada de células (color blancuzco) en las axilas de las hojas y en algunos casos en la base del tallo; de esta masa se desprendían algunas raíces, (véase figura 6 (a)). Pocas semanas más tarde se pudo observar la formación de una estructura similar a un microtubérculo joven (figura 6(b) y (c)); el cual en el extremo distal a su unión con la vitroplanta, presentaba una zona de color blanco y de crecimiento continuo, más tarde se presentó un microtubérculo desarrollado (figura 6(d)).

6.1.1 Experimento 1. El fotoperíodo tuvo efecto significativo sobre el número de explantes que tuberizaron y sobre el número de microtubérculos por explante. El fotoperíodo y la sacarosa afectaron significativamente el peso promedio y la biomasa total de los microtubérculos producidos.

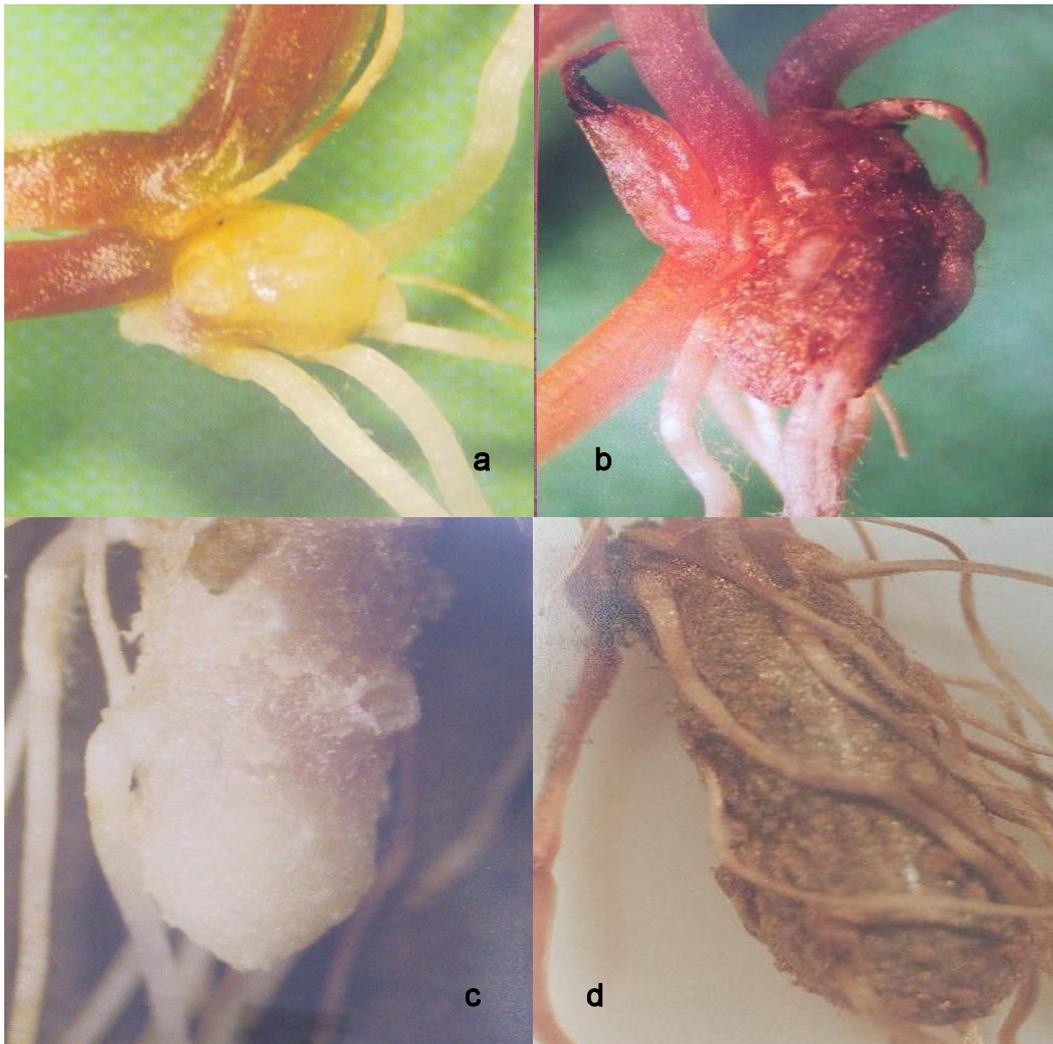


Figura 6. Estados de diferenciación y formación de microtubérculos encontrado en cultivo in vitro de segmentos nodales ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella". a) iniciación; b) formación de microtubérculo joven; c) alargamiento distal y d) microtubérculo maduro.

Teniendo en cuenta la interacción de los tres grupos de factores estudiados tenemos que hubo interacción significativa entre el fotoperíodo y la sacarosa (peso promedio y biomasa total de microtubérculos), fotoperíodo y sacarosa con Kinetina (número de microtubérculos por explante, peso promedio y biomasa total de microtubérculos).

Un fotoperíodo de 8 horas generalmente promovió la mayor inducción, formación y desarrollo de microtubérculos con mayor peso fresco que un fotoperíodo de 16 horas.

La concentración de sacarosa que soportó el mayor número de explantes tuberizados fue 60 g/L aunque el mayor número de microtubérculos por explante, peso promedio y biomasa total fueron estimulados por una concentración de 90 g/L.

A una concentración de 1.5 y 2.5 μM de Kinetina se presentó el mayor porcentaje de tuberización y a 1.5 μM el mayor número de microtubérculos por explante con respecto a las otras concentraciones utilizadas; la ausencia (0.0 μM) y una concentración de 2.5 μM de Kinetina en el medio de cultivo promovieron un peso promedio y una biomasa total de microtubérculos más alta que cuando se utilizó 1.5 μM de Kinetina. Los resultados de este experimento son presentados en el cuadro 5 y en las figuras 7, 8, 9 y 10

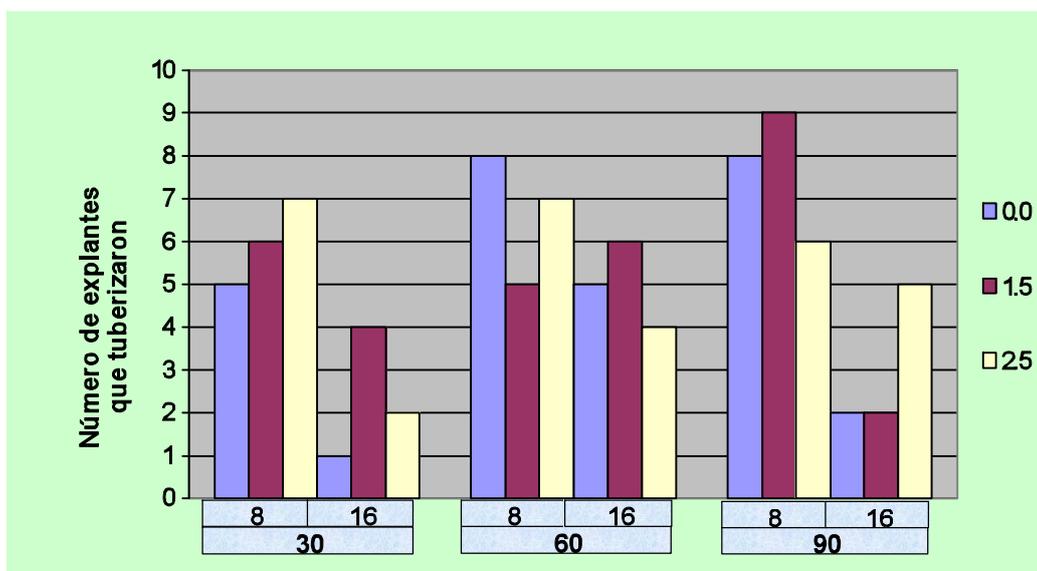


Figura 7. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de Kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μM) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el número de explantes que tuberizaron

Cuadro 5. Efecto del fotoperíodo, concentración de sacarosa y regulador de crecimiento (Kinetina) sobre el desarrollo de microtubérculos (MT) en cultivos de segmentos nodales de ñame *D. alata* L. var. "Pico de Botella".

A (fotoperíodo)	B (sacarosa) g/L	C (Kinetina) μ M	Tratamiento	Número de explantos cultivados	Número de explantos que tuberizaron	Número promedio de MT por explante	Peso promedio de MT por explante (mg)	Biomasa total de MT por explante (mg)
8	30	0	1	10	5	1.2	14.7333	89.2
		1.5	2	10	6	1	19.466	116.8
		2.5	3	10	6	1.16	23.942	167.6
	60	0	4	10	8	1.25	25.77	257.7
		1.5	5	10	5	1.2	23.416	167.4
		2.5	6	10	7	1.71	26.516	318.2
16	90	0	7	10	8	1.37	71.309	784.4
		1.5	8	10	9	1.77	35.775	572.4
		2.5	9	10	7	1.14	72.262	578.1
	30	0	10	10	1	1	3.8	3.8
		1.5	11	10	4	1	3.85	15.4
		2.5	12	10	2	1	6.1	12.2
60	0	13	10	5	1	12.16	60.8	
	1.5	14	10	6	1	19.666	118	
	2.5	15	10	4	1	4.45	17.8	
90	0	16	10	2	1	16.5	33	
	1.5	17	10	2	1	15.75	31.5	
	2.5	18	10	5	1	15.44	77.2	
TOTAL				180	92	1.228	411.0285	3421.5

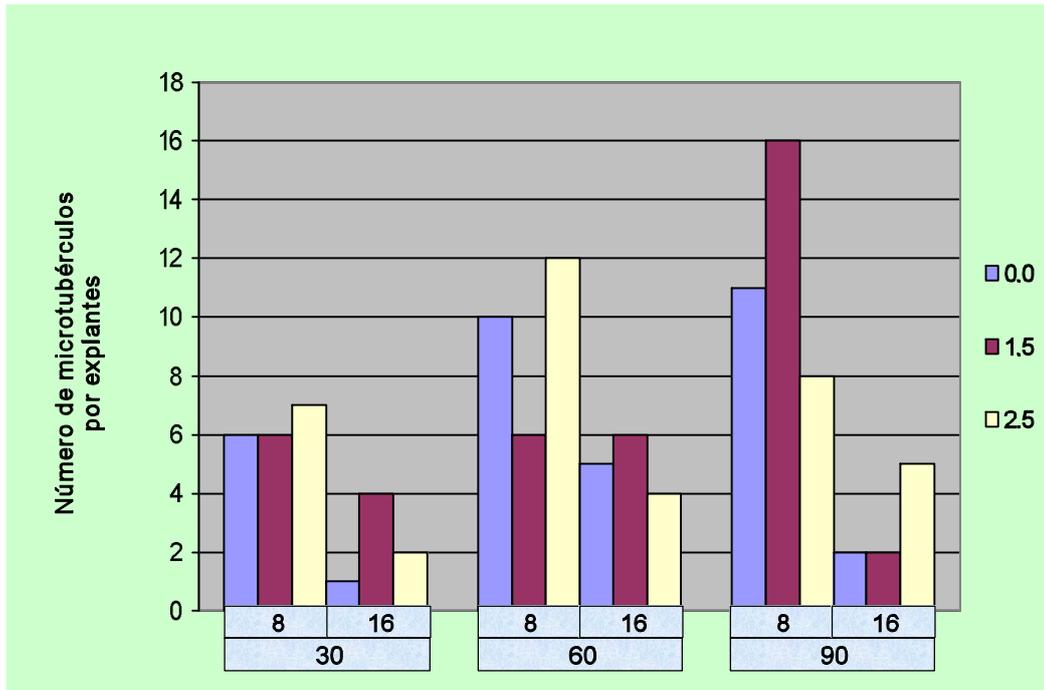


Figura 8. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de Kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μM) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el número de microtubérculos por explante que tuberizó

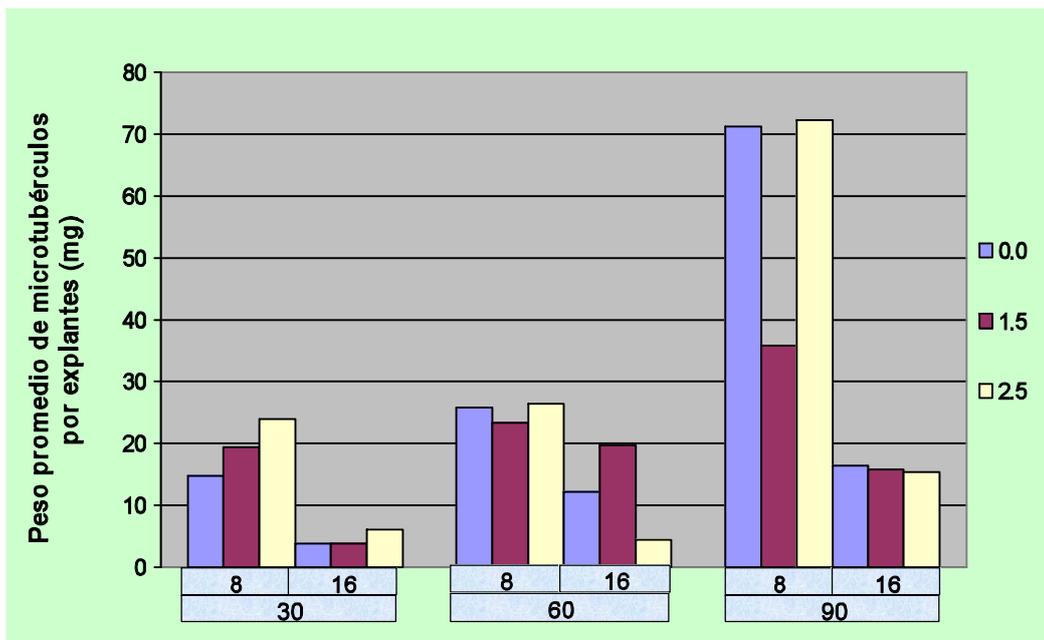


Figura 9. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de Kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μM) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el peso de microtubérculos por explante que tuberizó

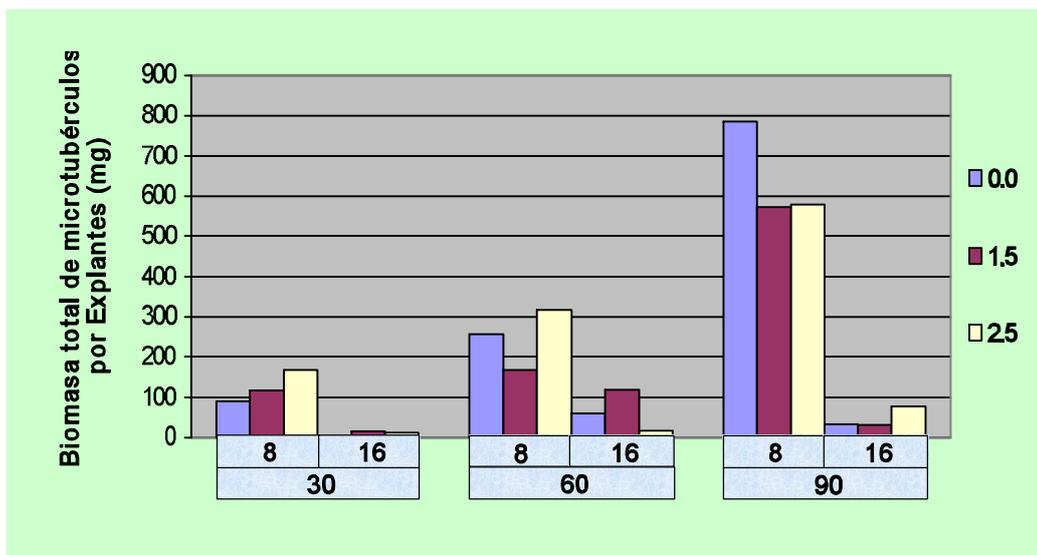


Figura 10. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de Kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μM) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre la biomasa total de microtubérculos por explante que tuberizó

En las gráficas anteriores se puede observar claramente una mejor respuesta a un fotoperíodo de 8 horas a medida que aumenta la concentración de sacarosa; presentándose un óptimo a una concentración de 90 g/L. Además, hay una marcada influencia por la presencia o ausencia del regulador de crecimiento. En las figuras 7 y 8, la respuesta óptima se da a 1.5 μM de Kinetina; en la figura 9 el óptimo es a una concentración de kinetina de 0.0 ó 2.5 μM y en la figura 10 el óptimo es en ausencia de Kinetina (0.0 μM).

6.1.2 Experimento 2. Con relación a éste hubo efecto significativo del fotoperíodo sobre la biomasa total de microtubérculos y de la sacarosa sobre el número de microtubérculos por explante y biomasa total de microtubérculos.

Teniendo en cuenta la interacción entre los grupos de factores estudiados se encontró que hubo interacción significativa entre el fotoperíodo y la sacarosa (número de explantes que tuberizaron, número de microtubérculos por explante y peso promedio de microtubérculos por explante), fotoperíodo y sacarosa con ABA (número de explantes que tuberizaron, número promedio de microtubérculos por explante, peso promedio y biomasa total de microtubérculos).

Al igual que en el experimento 1, ambos fotoperíodos influyeron en la producción de microtubérculos y al igual que en este en el fotoperíodo de 8 horas se presentó el más alto porcentaje de explantes que tuberizaron, número de microtubérculos, peso promedio y biomasa total que en el fotoperíodo de 16 horas.

La concentración de sacarosa en la cual se presentó el mayor número de explantes tuberizados, el mayor número de microtubérculos por explante, peso promedio y biomasa total de microtubérculos más alta fue a 60 g/L,

A una concentración de 1.0 μM de ABA se presentó el porcentaje de tuberización, peso promedio y la biomasa total de microtubérculos más alta con relación a las otras concentraciones de ABA utilizadas; mientras que la ausencia en el medio de cultivo de ABA (0.0 μM) influyó en un mayor número promedio de microtubérculos por explante; los resultados son presentados en el cuadro 7 y en las figuras 11, 12, 13 y 14.

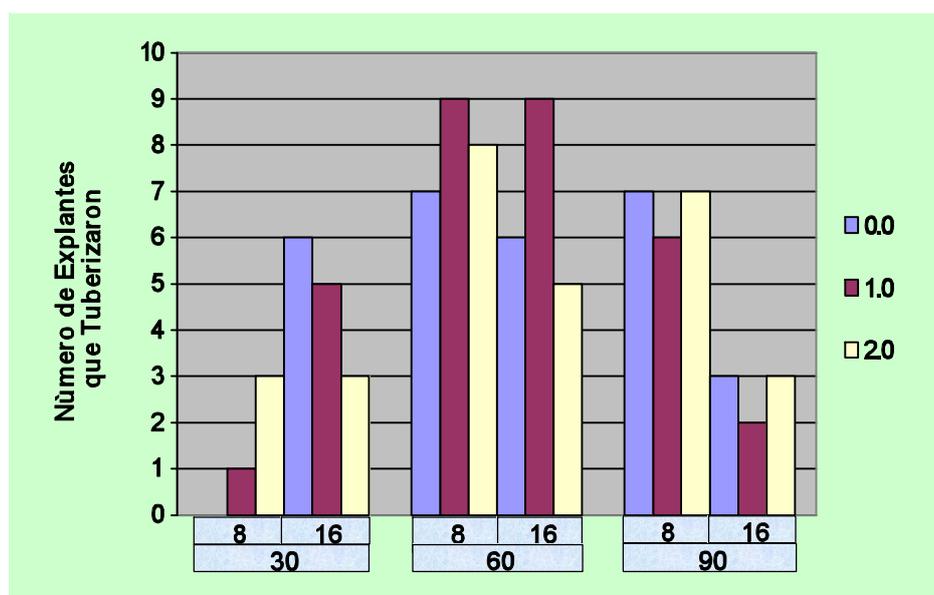


Figura 11. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de ABA (0.0, 1.0 y 2.0 μM) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el número de explantes que tuberizaron

Cuadro 6. Efecto del fotoperíodo, concentración de sacarosa y regulador de crecimiento (ABA) sobre el desarrollo de microtubérculos (MT) en cultivos de segmentos nodales de fiame *D. alata* L. var. "Pico de Botella".

A (fotoperíodo)	B (sacarosa) g/L	C (ABA) μM	Tratamiento	Número de explantos cultivados	Número de explantos que tuberizaron	Número de promedio de MT por explante	Peso promedio de MT por explante (mg)	Biomasa total de MT por explante (mg)
8	30	0	1	10	0	0	0	0
		1.0	2	10	1	1	24.5	24.5
		2.0	3	10	3	1	30.3	90.9
	60	0	4	10	7	1.71	41.483	497.8
		1.0	5	10	9	1.88	72.111	1225.9
		2.0	6	10	8	1.62	38.323	498.2
		0	7	10	7	1.28	41.822	376.4
	90	1.0	8	10	6	1	37.916	227.5
		2.0	9	10	7	1.14	68.436	547.5
		0	10	10	6	1.5	13.5	121.5
16	30	1.0	11	10	5	1	23.26	116.3
		2.0	12	10	3	1	10.833	32.5
		0	13	10	6	1.33	21.1	168.8
	60	1.0	14	10	9	1.33	22.825	273.9
		2.0	15	10	5	1	47.56	237.8
		0	16	10	3	2	21.833	131
90	1.0	17	10	2	1	12.5	25	
	2.0	18	10	3	1	19.266	57.8	
	TOTAL				180	90	1.355	547.57

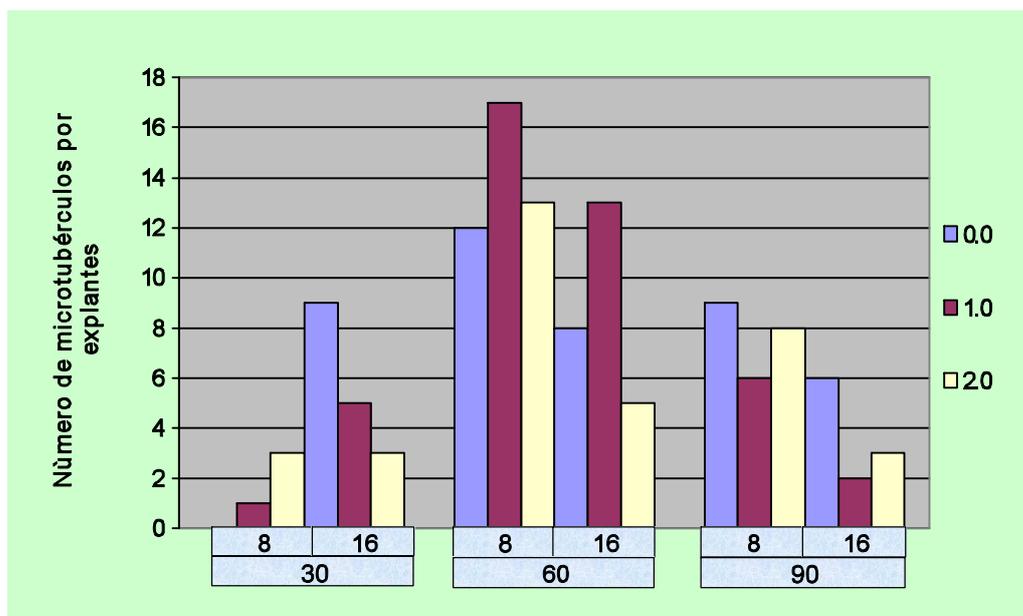


Figura 12. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de ABA (0.0, 1.0 y 2.0 μ M) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el número de microtubérculos por explante que tubericó

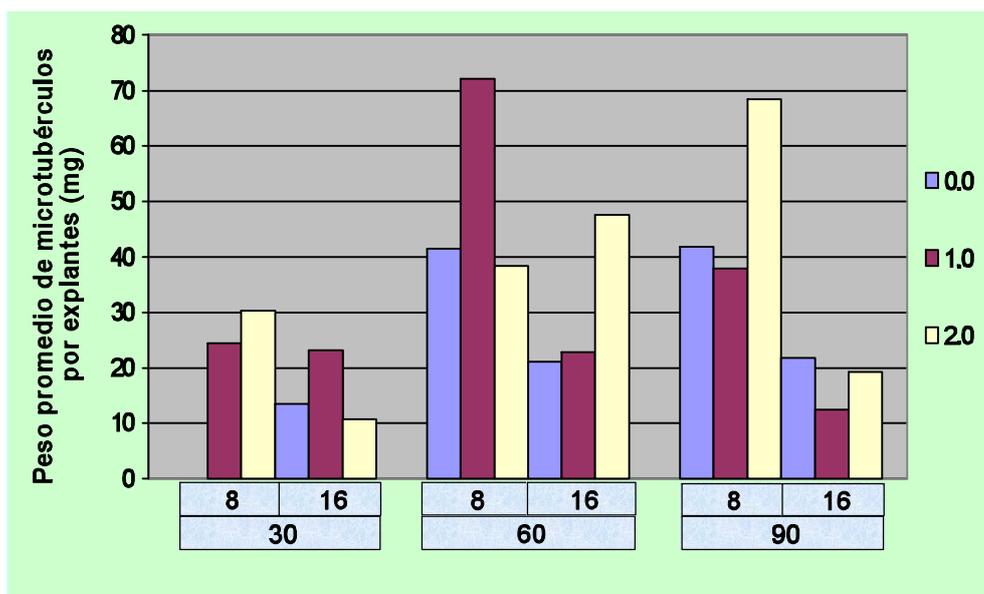


Figura 13. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de ABA (0.0, 1.0 y 2.0 μ M) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre el peso de microtubérculos por explante que tubericó

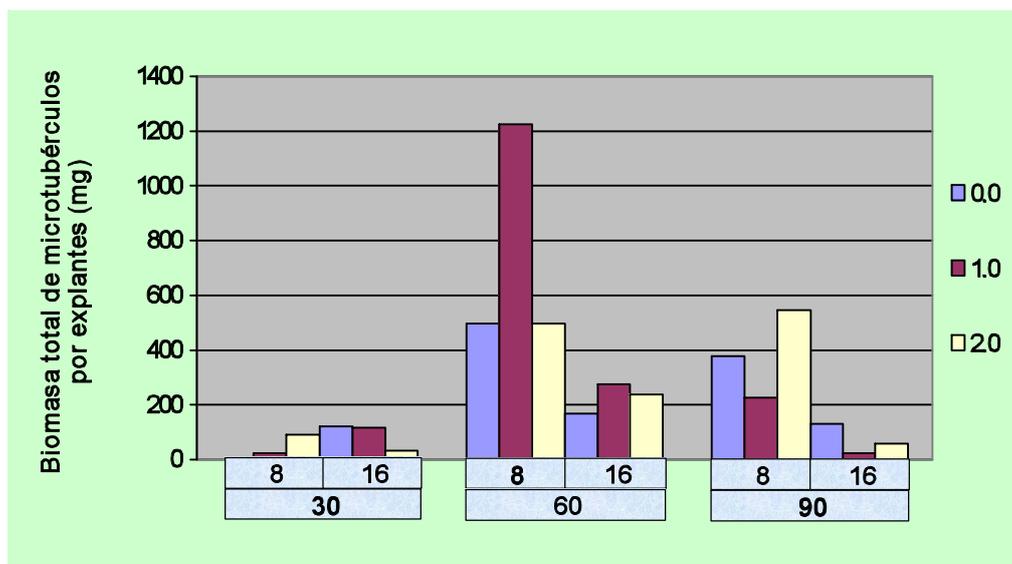


Figura 14. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de ABA (0.0, 1.5 y 2.5 μ M) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre la biomasa total de microtubérculos por explante que tuberizó

En estas figuras (11, 12, 13 y 14) se observa que la respuesta a un fotoperíodo de 8h se ve favorecida por una concentración de sacarosa de 60 g/L y disminuye a concentraciones de 30 o 90 g/L. Además, la interacción de estos niveles con 1.0 μ M de ABA favorecen una mejor respuesta para cada uno de los parámetros evaluados.

6.1.3 Experimentos 3 y 4. En estos experimentos donde las sales utilizadas fueron las del medio basal MS; ninguno de los niveles de los factores utilizados influenció la inducción y formación de microtubérculos. En este caso los cultivos expresaron una alta sensibilidad a las condiciones de cultivo en el sentido que se presentó una alta formación de callo en la base del tallo; este fenómeno se pudo observar a ambos fotoperíodos y en las concentraciones de sacarosa utilizadas (véase figura 15), estructuras como las descritas aquí también fueron observadas por Ng (1988) cuando el medio MS fue utilizado.

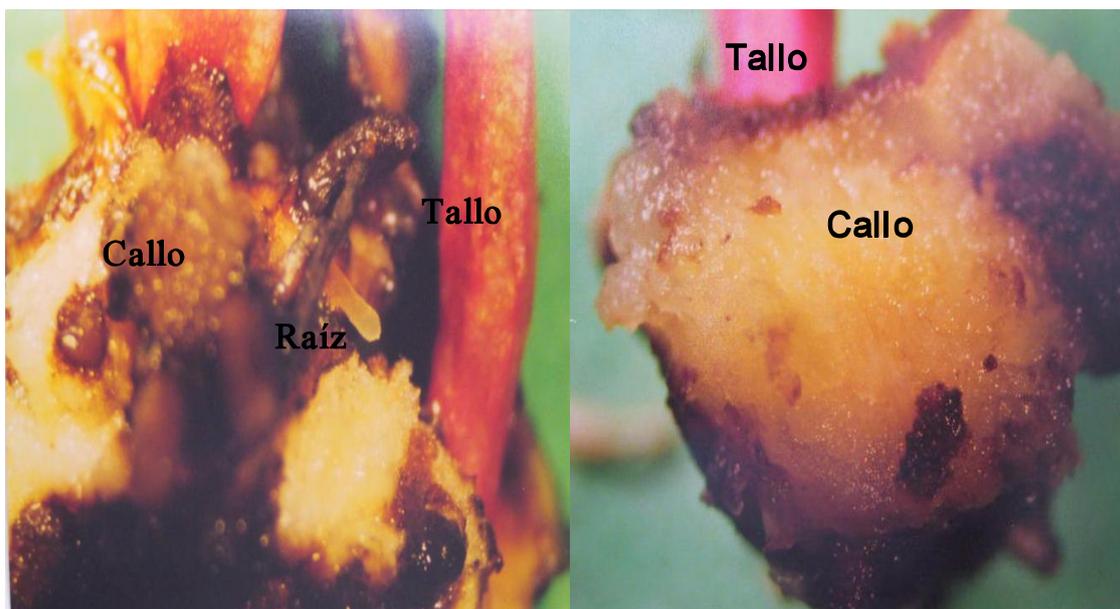


Figura 15. Formación de callo en cultivos de segmentos nodales de ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella" cultivados en medio MS.

Ahora comparando los resultados obtenidos en los experimentos 1 y 2 se tiene que el mayor número de explantes tuberizados (92) se presentó en el experimento 1 y en el experimento 2 (90 explantes tuberizados)

Con relación al número promedio de microtubérculos por explante; para el experimento 1 fueron 1.228 microtubérculos por explante y para el experimento 2 fueron 1.355 microtubérculos por explante. Los pesos promedios de microtubérculos fueron: 415.368 y 547.57 mg para el experimento 1 y 2 respectivamente. La biomasa total de los microtubérculos producidos fue para el experimento 1: (3421.5 mg) y para el 2: (4653.3 mg).

En el experimento 1 se obtuvo 113 microtubérculos (véase figura 16) los cuales presentaron un peso entre 2.3 y 169.6 mg, una longitud de 1.3 a 22.2 mm y un diámetro entre 1.5 y 5.5 mm.

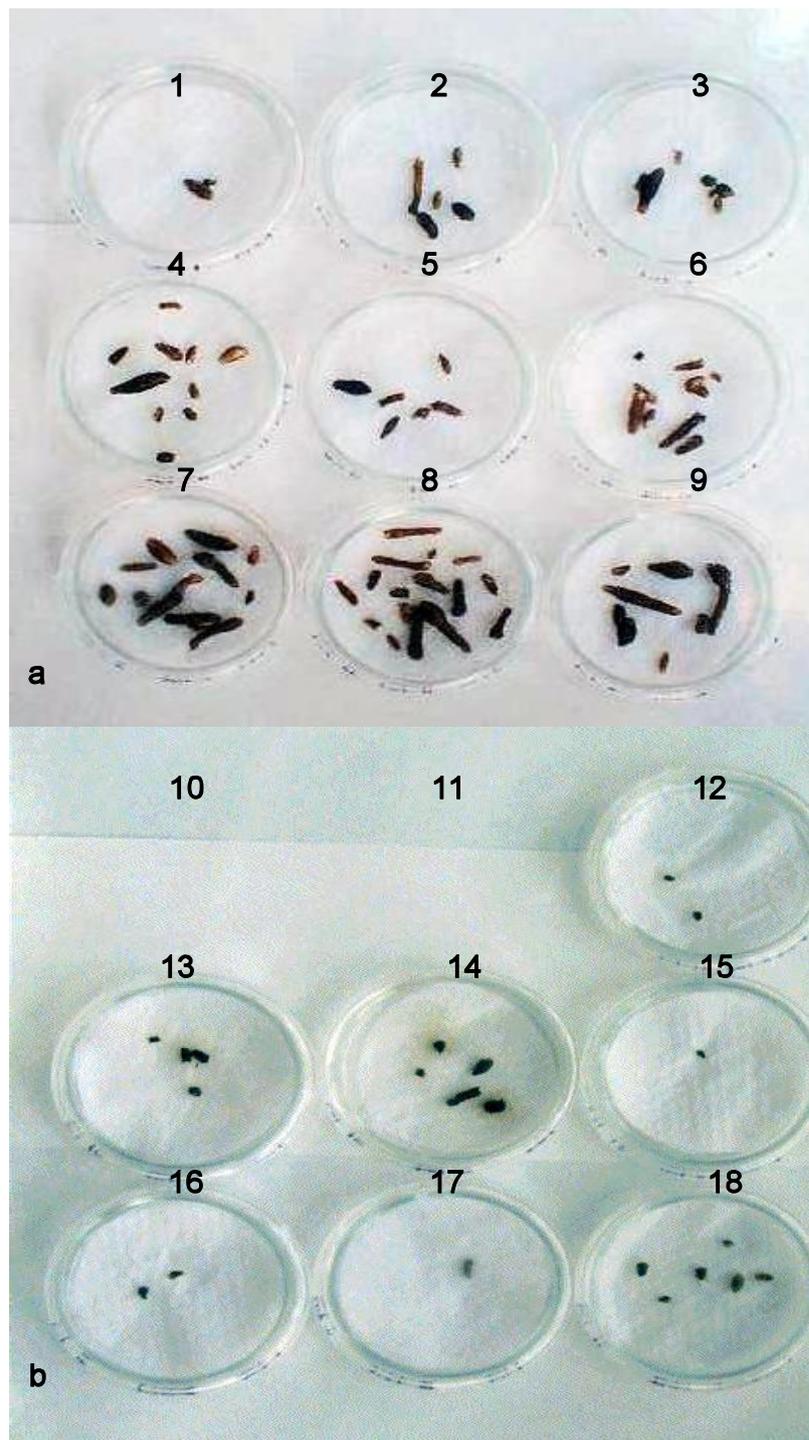


Figura 16. Microtubérculos cosechados y almacenados en cajas de petri con papel absorbente humedecido, correspondiente a los tratamientos 1 al 18 en el experimento 1 bajo un fotoperíodo de 8 h (a) y fotoperíodo de 16 h (b).

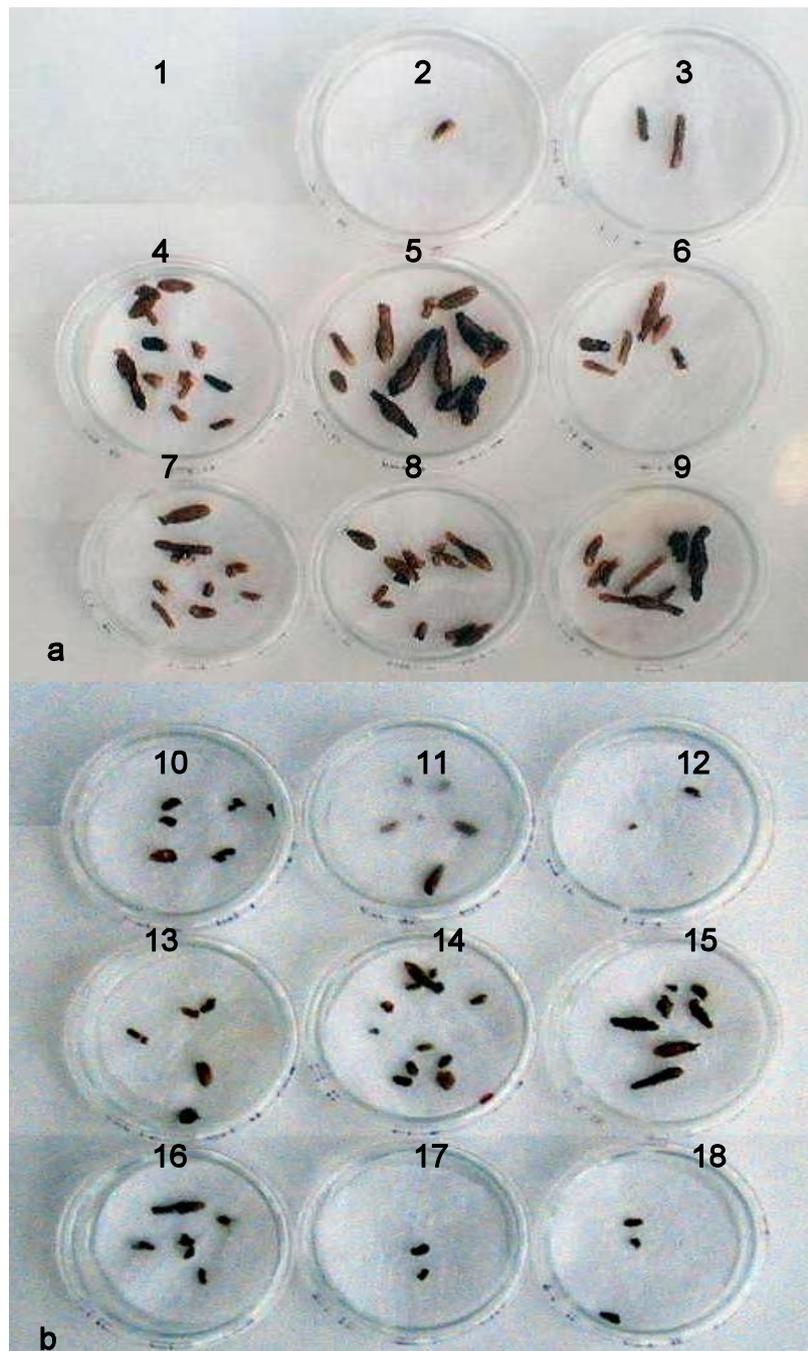


Figura 17. Microtubérculos cosechados y almacenados en cajas de petri con papel absorbente humedecido, correspondiente a los tratamiento 1 al 18 en el experimento 2 bajo un fotoperíodo de 8 h (a) y fotoperíodo de 16 h (b).

En el experimento 2 se obtuvo 122 microtubérculos con un peso entre un rango de 5.0 y 217.4 mg (figura 17), una longitud entre 2.8 y 22.8 mm y un diámetro de 1.5 a 10.2 mm.

Los microtubérculos fueron clasificados en tres categorías de acuerdo al peso;

teniendo para el experimento 1 :

- < 50 mg : 93 microtubérculos
- ≥ 50 mg : 11 microtubérculos
- ≥ 100 mg : 9 microtubérculos

y para el experimento 2 :

- < 50 mg : 93 microtubérculos
- ≥ 50 mg : 18 microtubérculos
- ≥ 100 mg : 11 microtubérculos

La mayoría de los microtubérculos producidos fueron aéreos, pocos microtubérculos basales se originaron (véase figura 18).

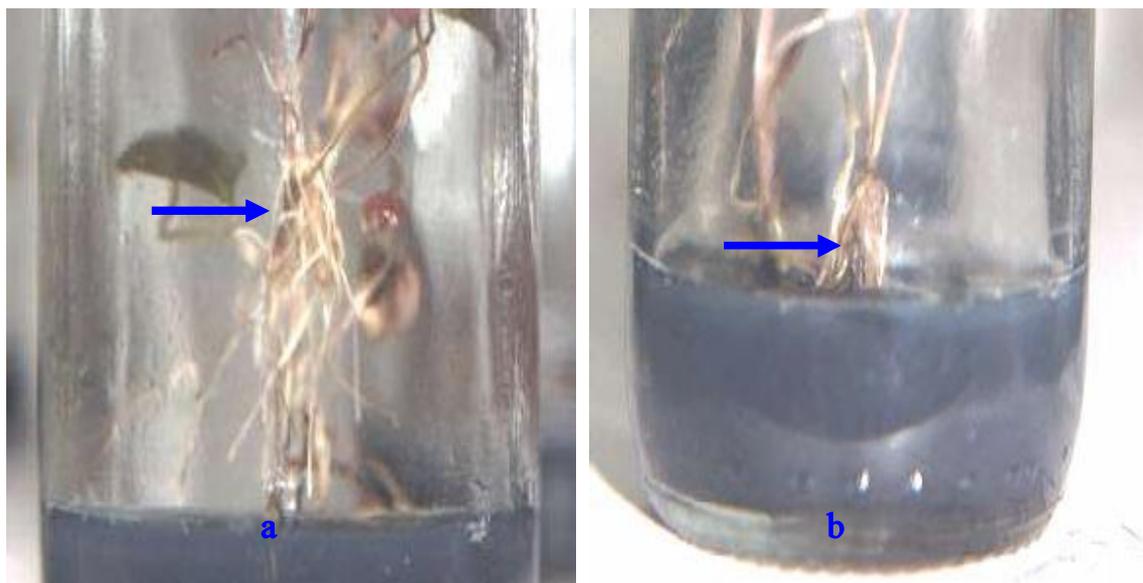


Figura 18. Formación de microtubérculos a diferentes posiciones a lo largo de la vitroplanta, a) aéreo y b) basal.

Un resumen de los efectos del fotoperíodo, sacarosa y regulador de crecimiento utilizado sobre cada una de las variables evaluadas son presentados en cuadro 7.

Cuadro 7. Efectos principales del fotoperíodo, concentración de Sacarosa y regulador de crecimiento sobre el desarrollo de microtubérculos en cultivos de segmentos nodales de ñame *D. alata* L. var. "Pico de Botella".

FACTOR	N. De explantes cultivados	% de explantes que tuberizaron	Número promedio de MT por explante que tuberizó	Peso promedio de MT por explante (mg.)	Biomasa total (mg.)
EXPERIMENTO 1					
(a) Fotoperíodo Horas					
8	90	67.77 a	1.3442 a	37.217 a	3051.8 a
16	90	34.44 b	1 b	11.9258 b	369.7 b
(b) Sacarosa g/L					
30	60	41.666 a	1.04 a	15.5769 a	405 a
60	60	58.333 a	1.2285 a	21.8581 b	939.9 b
90	60	53.333 a	1.375 a	47.1954 c	2076.6 c
(c) Kinetina μM					
0	60	48.333 a	1.2068 a	35.1114 a	1228.9 a
1.5	60	53.333 a	1.25 a	25.5375 a	1021.5 a
2.5	60	51.666 a	1.2258 a	30.8184 a	1171.1 a
EXPERIMENTO 2					
(a) fotoperíodo Horas					
8	90	53.333 a	1.4375 a	50.5608 a	3488.7 a
16	90	46.666 a	1.2619 a	21.9754 b	1164.7 b
(b) Sacarosa g/L					
30	60	30 a	1.1666 a	18.3666 a	385.7 a
60	60	73.333 b	1.5227 b	43.3194 b	2902.4 b
90	60	46.666 c	1.2142 c	40.1529 b	1365.2 c
(c) ABA μM					
0	60	48.333 a	1.5172 a	29.4431 a	1295.5 a
1.0	60	53.333 a	1.3437 a	44.0255 a	1893.1 a
2.0	60	48.333 a	1.2068 a	41.8485 a	1464.7 a

El incremento en el número de microtubérculos y la biomasa total observada a 8 horas puede ser atribuida a la longitud del fotoperíodo.

Jean y Cappadocia (1991) reportaron mayor número de microtubérculos en la base de los tallos a un fotoperíodo de 8 horas, en este reporte el mayor número de microtubérculos presentados fueron aéreos tanto a un fotoperíodo de 8 como a 16 horas; además, el número más alto de microtubérculos fue obtenido a 8 horas y no a 16 como lo reportado por los autores mencionados anteriormente.

El efecto inhibitorio del medio MS en los cultivos de *D. alata* var. "Pico de Botella"; concuerda con los reportes presentados por Mantell y Hugo (1989).

El desarrollo de microtubérculos en medio MT al igual que lo expuesto por John et al, (1993) fue más estimulado por la presencia de ABA en el medio; la utilización de Kinetina en el medio MT no presentó diferencias significativas sobre el desarrollo de estos.

Aunque se observó un alto número de microtubérculos en el fotoperíodo de 16 horas; este fotoperíodo no promovió el desarrollo de los microtubérculos; lo cual se ve reflejado en los pesos promedios y biomasa total bajos con respecto a los obtenidos a un fotoperíodo de 8 horas en ambos experimentos.

En general algunos de los resultados presentados aquí y los reportados por otros autores indican que los factores de cultivo que en primera instancia favorecen la producción de un mayor número de microtubérculos son a menudo diferentes y algunas veces no favorecen el desarrollo de estos.

7. CONCLUSIONES

- La utilización del medio de tuberización es esencial para la inducción, formación y desarrollo de microtubérculos en ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella".
- La sacarosa en el desarrollo de los microtubérculos tuvo un óptimo a una concentración de 90 g/L en el experimento 1 y 60 g/L para el experimento 2.
- Aunque no hubo diferencias significativas entre los niveles de reguladores de crecimiento utilizados, se presentó una biomasa más alta en ausencia de kinetina con relación a las concentraciones de 1.5 y 2.5 μM utilizadas para el experimento 1; y en el experimento 2, el mejor efecto sobre el desarrollo de los microtubérculos se presentó a una concentración de 1.0 μM de ABA.
- La longitud del fotoperíodo tiene una fuerte influencia sobre el desarrollo de microtubérculos en (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella" dándose un mejor desarrollo de los microtubérculos a un fotoperíodo de 8 horas en ambos experimentos.
- En este estudio se reportó el efecto inhibitorio del medio MS sobre el proceso de tuberización en (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella", lo cual puede ser debido a la presencia de altos niveles de nitrógeno en las formas de nitrato de amonio y nitrato de potasio en este medio (Jean y Cappadocia, 1991; Mantell y Hugo, 1989); además, este resultado puede estar sujeto al genotipo utilizado.

- Los resultados presentados en este trabajo sugieren que cada uno de los factores evaluados no favorecen por sí solos la inducción, formación y desarrollo de microtubérculos; sino que , la regulación del desarrollo de estos órganos de almacenamiento implica la interacción entre ellos.
- El cultivo in vitro de microtubérculos permitiría estudiar aspectos morfogénéticos de los procesos de tuberización bajo condiciones controladas en plantas de ñame.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar nuevos trabajos en los cuales se modifiquen parámetros de cultivo como concentración de sacarosa, reguladores de crecimiento y fotoperíodo que permitan mejorar los niveles de tuberización en un período de tiempo más corto.
- Estudios posteriores sobre germinación de microtubérculos deben ser realizados para llegar a decidir si es más conveniente producir un mayor número de microtubérculos independiente del tamaño o encaminar esfuerzos a la búsqueda de condiciones de cultivo que permitan obtener a la vez, un mayor número de microtubérculos de mayor tamaño que toleren mejor una manipulación y transporte.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta C., El cultivo del ñame. Bogotá. TOA. 1980. 79p.

Acosta P. R., Beltrán H. J. Estandarización de la técnica de micropropagación para la obtención masiva de plantas de ñame espino (*Dioscorea rotundata*) mediante el cultivo In vitro de segmentos nodales. Memorias XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. ACCB. Cartagena de Indias. Octubre, 2001.

Alhasan A. Y. 1998. Cultural factors affecting clonal propagation and microtuberization of *Dioscorea alata* L. food yam. Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT, Cali, Colombia En: Proceedings of the first international scientific meeting cassava biotechnology network. Cartagena de Indias, 1992. p. 185-189

Ammirato P. V. Handbook of Plant Cell Culture: YAM. Tomo IV. MacMillan Publishing CO. New York. 1983

_____ , Hormonal control of tuber formation in cultured axillary buds of *Dioscorea bulbifera* and *D. alata*. Plant physiol. 57 (1976). (suppl);66.

Arena M. E. y Martínez G. El cultivo In vitro en la propagación de plantas. PROVEG del CADIC. 1999

Disponible en Internet <http://www.tierradelfuego.org.ar/cadic/proveg.htm>

Arteca R. N. Plant growth Substances: Principles and Applications. Chapman and Tuberization Hall, New York. 1995. 332 p.

Disponible en Internet <http://garden.cas.psu.edu/courses/hort420/index.html>

Buitrago, H. G. Programa de biotecnología agrícola HOLLANDA-COLOMBIA. En: ÑAME: Producción de semillas por biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Santa fe de Bogotá. 2000. p 11-16

Cano, C. G. y De la F. Marroquín., Taxonomía de plantas superiores. México. Trillas, 1994. 359p

Coursey D. G: Evolution of crop plants : Yams. London. Edited N. M: Simmonds. 1976. p. 70-73.

Correa J. E. y H. J. Bernal., Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Santafé de Bogotá Tomo VII. Ed Guadalupe.. 1992. p 1-92

Espitia A. A. y Quintero I. 1999. Estandarización de la técnica de micropropagación por embriogenesis somática en ñame (*D. alata*) var. Diamante 22. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo). Universidad de Cordoba. Facultad de ciencias agrícolas. Programa de Ingenieria agronómica. Montería.

Forsyth C. & Van Staden J. Tuberization of *Dioscorea bulbifera* stem nodes in culture. En: J plant physiology, 115(1984). 79-83.

George E. & P. Sherrington., Plant Propagation by Tissue Culture: The tecnology. Exegetics Limited. 1993. 281p

Jean M. & Cappadocia. M, Effects of some growth regulators on in vitro tuberization in *Dioscorea alata* L. "Brazo fuerte" and *D. abyssinica* Hoch. En: Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 31(1992). 163-170

_____, _____ In vitro tuberization in *Dioscorea alata* L. "Brazo Fuerte" and "Florido" and *D. abyssinica* Hoch. En: Plant Cell, Tissue and Organ Culture 26(1991). 147 – 152

John Joan. L., E. M. Courtney W. H. & Decoteau. D. The influence of plant growth regulators and light on microtuber induction and formation in *Dioscorea alata* L. Cultures. En: Plant Cell, tissue and organ culture. 34(1993). 245 – 252

Krikorian A. D. In vitro culture of root and tuber crops. Plant cell and tissue culture. 1994. 379-411.

Lauzer D. , Laublin G. , Vincent G. & Cappadocia M. In vitro propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica* Hoch. And *D. manenotiana* Miège. En: Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 28(1992). 215-223.

Mantell S. H., Hague S. Q. & F. L. Shandler. Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el ñame. En: Curso taller aplicaciones de los sistemas in vitro en el cultivo de ñame (*Dioscorea alata* L.) Santafé de Bogotá. Universidad Nacional. 1998

_____ , & Hugo S. A., Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinina on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. Plant En: Cell, Tissue and organ culture 16(1989). 23 – 37

_____ , Hague S. Q. & A. Whitehall., Apical meristem Tip culture for eradication of flexous rot viruses in yams *Dioscorea alata*. En: Tropical pest Management 26 (2) (1980). 170 – 179.

_____ , _____ , _____ Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea rotundata* poir. Yams by Tissue Culture. En: J Hortic. Sci. 53(1978). 93-95.

Mitchell, S., Asemota. H. & Ahmad M. Effects of explant source, culture medium strength and growth regulators on the in vitro propagation of three Jamaican Yams

(*Dioscorea cayenensis*, *D. trifida* and *D. rotundata*) En: J. Sci. Food Agric. 67(1995). 173-180.

Moura – Costa, P. H., Kandasamy, K. I. & Mantell. S. H. Evaluation of in vitro screening methods for assessing anthracnose disease reactions in tropical yams (*Dioscorea spp*). En: Tropical Agriculture (Trinidad) V 70 N 2(1993). 147 – 152.

Nagasawa A. & Finer, J. J. Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of chinese Yam (*Dioscorea opposita* Thunb.). En: Plant cell report. 28(1989). 215-223

Ng, S. Y. C., Micropropagation of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). En: Biotechnology in agriculture and forestry. 19(1992). 135 – 158.

_____ , In vitro tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). En: Plant cell, tissue and organ culture 14(1988). 121 – 128

Onwueme, I. C. & Charles, W. B: Tropical root and tuber crops : production, perspectives and future prospects. FAO. Plant production paper 126. Roma. 1994. p. 51-70

_____ , The tropical tuber crops : yams, cassava, sweet potato, cocoyams. Department of plant science university of Ife. Nigeria. 1978. p. 3-35.

Osagie A. V. The yam: tuber in storage. University of Benin. Department of Biochemistry. Benin-Nigeria. 1992. p. 11-42.

Osorio C. y N. Ramirez., Principales enfermedades del ñame en la región caribe colombiana. ICA – INFORMA. Vol. 23 N° 1(1989). 13-19.

Perea, D. M. y Buitrago, H. G. Aplicación de la biotecnología al cultivo de ñame.

En: ÑAME: Producción de semillas por biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Santa fe de Bogotá. 2000.

Plan Operativo., Sistema de producción yuca y ñame. CORPOICA. 1998.

Ramirez C. J., A. Roldan, E. Yepes y P. Alzate., El cultivo del ñame (*Dioscorea spp.*) y sus posibilidades de industrialización. Cuadernos académicos Quirama., 10.(1990). 41-43.

Rodríguez J. C. y Beltrán H. J. Cultivo In vitro de ñame (*Dioscorea alata* L.) C.V. Pico de Botella" a partir de segmentos nodales. Memorias XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. ACCB. Cartagena de Indias. Octubre, 2001.

Sondhal, M. R., Sistemas de bioreactores para la propagación de plantas. En: Boletín Científico. ACEVIC. Bogotá. V 4 N°3(1992). 25 – 30.

_____, R., Sharp, E. R. & Evans, D. E., Biotechnology of cultivates crops. En: Boletín Científico. ACEVIC. Bogotá. V 4 N° 3(1993). 25 – 30

Thouvenel J. C., & Fauquet, C. Yam mosaic, A new potyvirus infecting *Dioscorea cayenensis* in the Ivery Coast. En: Annales of Applied Biology 93(1979). 279 – 283

Tör , M. Ainsworth C. & Mantell S.H. Stable transformation of the food yam *Dioscorea alata* L. by particle bombardment. En: Plant cell reports. 12(1993). 468-473.

_____, Mantell H.S & Ainsworth, C. Endophytic bacteria-expressing β -glucoronidasa cause false positives in transformation of *Dioscorea* species. En: Plant cell report.. 11(1992). 452-456

Twyford C. T. & Mantell S: H. Production of somatic embryos and plants fromm

root cells of the greater Yam. En: Plant Cell, Tissue and organ culture. 46(1996).17-26

Unidad Regional de Planificación Agropecuaria – URPA., Anuario estadístico. Ministerio de Agricultura. 1997.

Unidad Regional de Planificación Agropecuaria – URPA., Anuario estadístico. Ministerio de Agricultura. 1998.

Uwe, S. Yam (ñame) – Una importante planta útil de Africa Occidental. En: Correo fitosanitario. Bayer.. V 2(1988) 7 – 10

Wydra K. & Yaninek, J. S. Les principaux ravageurs et maladies d’Afrique: manioc, igname, patate douce et aracces. L’institut International d’Agriculture Tropicale. Cotonou (Benin) 1993.

ANEXOS

ANEXO A. Participación Sobre La Producción Nacional De Ñame - 1997

Departamento	Producción (Ton.)	Participación %
Córdoba	68.162	53.46
Bolívar	23.266	18.25
Sucre	19.566	15.34
Cesar	5.000	3.92
Antioquia	4.411	3.46
Chocó	3.105	2.44
Magdalena	2.250	1.76
Guajira	1.592	1.25
San Andrés y Prov. Atlántico	80	0.06
Total	127.512	100.00

Fuente URPA 1997

ANEXO B. Medio Murashige Y Skoog (1962)

Solución Stock	Sales	Concentración Stock mg/L
A	NH ₄ NO ₃	82.9
B	KNO ₃	95.0
C	CaCl ₂ ·2H ₂ O	88.0
D	KH ₂ PO ₄	34.0
E	H ₃ BO ₃	1.24
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂	0.05
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.005
	KI	0.166
F	MgSO ₄ ·7H ₂ O	74.0
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.45
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.72
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005
G	Na ₂ EDTA	7.46
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5.57
H	Tiamina	0.02
	Acido nicotínico	0.1

Según George, (1993)

ANEXO C. Medio De Tuberización (MT)

MACROSALES DE WHITE (1953)	
Sales	Concentración (mg/L)
KNO ₃	80
Ca(NO ₃) ₂	300
MgSO ₄ ·7H ₂ O	720
Na ₂ SO ₄	200
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	16.5
KCl	65
MICROSALES DE HELLER (1939)	
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.01
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1
H ₃ BO ₃	1.24
KI	0.01
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.03
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.03
AlCl ₃	0.03
Fe ₂ (SO ₄) ₃	25.0

Según Mantell and Hugo, (1989)

ANEXO D. ANALISIS DE VARIANZA Y COMPARACION MULTIPLE EXPERIMENTO 1

• NUMERO DE EXPLANTES QUE TUBERIZARON

Análisis de varianza del número de explantes que tuberizaron. Experimento 1.

FUENTE	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
A (FOTOPERIODO)	1	5.0	5.0	12.7356 **	5.12	10.56
Error	9	3.5333	0.4491			
Total parcela	19					
B (SACAROSA)	2	0.8778	0.4389	0.7621ns	3.26	5.25
AB	2	0.700	0.3500	0.6077ns	3.26	5.25
Error	36	20.7333	0.5759			
Subtotal subparcelas	40					
TOTAL	59					
C (KINETINA)	2	0.0778	0.0389	0.1015ns	3.09	4.82
AC	2	0.2333	0.1166	0.3045ns	3.09	4.82
BC	4	0.5222	0.2611	0.6819ns	2.46	3.51
ABC	4	3.0222	0.7555	1.9731ns	2.46	3.51
Error	108	41.3556	0.3829			
Subtotal	120					
Total subsubparcelas	179					

** : Diferencia altamente significativa

* : Diferencia significativa

ns: No hay diferencia significativa

PRUEBA DE DUNCAN

- Error estándar S(x)

$$S(x) = \frac{CME}{r}$$

r: No de repeticiones

CME: Cuadrado medio del error

GLE: Grados de libertad del error

Teniendo en cuenta que hay diferencia altamente significativa entre el factor (a) fotoperíodo, tenemos:

$$S(x) = \frac{0.3926}{10} = 0.1981 \quad \text{GLE : 9}$$

RES: Rangos estudentizados significativos

RMS: Rangos mínimos significativos

P: No de medias para rangos probados

P 2
RES 3.20
RMS 0.6392

- Ordenar las medias de menor a mayor

F 16 F 8
3.1 6.1

- Probar las diferencias

$|6.1 - 3.1| = 3.0 > 0.6392$ Significativamente diferentes

- **NUMERO PROMEDIO DE MICROTUBERCULOS POR EXPLANTES QUE TUBERIZO**

Análisis de varianza de el número promedio de microtubérculos por explantes.
Experimento 1.

FUENTE	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
A (FOTOPERIODO)	1	5.3389	14.45	13.2253 **	5.12	10.56
Error	9	14.45	1.0926			
Total parcela	19					
B (SACAROSA)	2	3.4112	1.7056	1.6769ns	3.26	5.25
AB	2	2.0333	1.0166	0.9995ns	3.26	5.25
Error	36	36.6167	1.0171			
Subtotal subparcelas	40					
TOTAL	59					
C (KINETINA)	2	0.2112	0.1056	0.1731ns	3.09	4.82
AC	2	0.1	0.05	0.0819ns	3.09	4.82
BC	4	1.2888	0.3222	0.5281ns	2.46	3.51
ABC	4	8.2888	2.0722	3.3970*	2.46	3.51
Error	108	65.8888	0.6100			
Subtotal	120					
Total subsubparcelas	179					

** : Diferencia altamente significativa

* : Diferencia significativa

ns: No hay diferencia significativa

PRUEBA DE DUNCAN

- Error estándar $S(x)$

$$S(x) = \frac{CME}{r}$$

r: No de repeticiones

CME: Cuadrado medio del error

GLE: Grados de libertad del error

Teniendo en cuenta que hay diferencia altamente significativa entre el factor (a) fotoperíodo, tenemos:

$$S(x) = \frac{1.0926}{10} = 0.3305 \quad \text{GLE : 9}$$

RES: Rangos estudentizados significativos

RMS: Rangos mínimos significativos

P: No de medias para rangos probados

P 2

RES 3.20

RMS 1.0577

- Ordenar las medias de menor a mayor

F 16

F 8

3.1

8.2

- Probar las diferencias

$$|8.2 - 3.1| = 5.1 > 1.0577 \quad \text{Significativamente diferentes}$$

- PESO PROMEDIO DE MICROTUBERCULOS POR EXPLANTE QUE TUBERIZO

Análisis de varianza del peso promedio de microtubérculos por explantes. Experimento 1.

FUENTE	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
A (FOTOPERIODO)	1	24203.4	24203.4	29.6639 **	5.12	10.56
Error	9	11586.04	815.92			
Total parcela	19					
B (SACAROSA)	2	15663.94	7831.97	4.8510*	3.26	5.25
AB	2	13374.46	6687.23	4.1420*	3.26	5.25
Error	36	58121.47	1614.48			
Subtotal subparcelas	40					
TOTAL	59					
C (KINETINA)	2	531.65	265.82	0.1872ns	3.09	4.82
AC	2	1307.72	651.36	0.4589ns	3.09	4.82
BC	4	1897.17	474.29	0.3341ns	2.46	3.51
ABC	4	17974.48	4493.62	3.1661*	2.46	3.51
Error	108	153283.84	1419.29			
Subtotal	120					
Total subsubparcelas	179					

** : Diferencia altamente significativa

* : Diferencia significativa

ns: No hay diferencia significativa

PRUEBA DE DUNCAN

- Error estándar S(x)

$$S(x) = \frac{CME}{r}$$

r: No de repeticiones

CME: Cuadrado medio del error

GLE: Grados de libertad del error

Teniendo en cuenta que hay diferencia altamente significativa entre el factor (a) fotoperíodo, tenemos:

$$S(x) = \frac{815.92}{10} = 9.027$$

GLE : 9

RES: Rangos estudentizados significativos

RMS: Rangos mínimos significativos

P: No de medias para rangos probados

P 2
RES 3.20
RMS 28.888

- Ordenar las medias de menor a mayor

F 16	F 8
369.7	2457.20

- Probar las diferencias

$|2457.20 - 369.7| = 2087.5 > 28.888$ Significativamente diferentes

Teniendo en cuenta además que hay diferencia significativa entre el factor (b) concentración de sacarosa, tenemos:

$$S(x) = \frac{1614.8}{10} = 12.7074 \quad \text{GLE : 36}$$

P 2 3
RES 2.89 3.01
RMS 36.7246 38.2495

- Ordenar las medias de menor a mayor

(30g/L) b ₁	(60g/L) b ₂	(90g/L) b ₃
392.85	723.57	1710.48

- Probar las diferencias

$|1710.48 - 392.85| = 1317.63 > 38.2495$ Significativamente diferentes

$|1710.48 - 723.57| = 986.91 > 36.7246$ Significativamente diferentes

$|723.57 - 392.85| = 330.72 > 36.7246$ Significativamente diferentes

- **BIOMASA TOTAL DE MICROTUBÉRCULOS POR EXPLANTE**

Análisis de varianza de la biomasa total de microtubérculos por explantes. Experimento 1.

FUENTE	GL	SC	CM	F _c	F _t	
					5%	1%
A (FOTOPERIODO)	1	39984.79	39984.79	31.06 **	5.12	10.56
Error	9	11586.04	1287.33			
Total parcela	19					
B (SACAROSA)	2	24311.49	12155.7	5.42 **	3.26	5.25
AB	2	20541.01	10270.5	4.58*	3.26	5.25
Error	36	80626.2	2239.61			
Subtotal subparcelas	40					
TOTAL	59					
C (KINETINA)	2	401.88	200.94	0.107ns	3.09	4.82
AC	2	1052.86	526.43	0.2804ns	3.09	4.82
BC	4	1094.78	273.695	0.1457ns	2.46	3.51
ABC	4	25172.49	6293.12	3.35*	2.46	3.51
Error	108	202750.7	1877.32			
Subtotal	120					
Total subsubparcelas	179					

** : Diferencia altamente significativa

* : Diferencia significativa

ns: No hay diferencia significativa

PRUEBA DE DUNCAN

- Error estándar S(x)

$$S(x) = \frac{CME}{r}$$

r: No de repeticiones

CME: Cuadrado medio del error

GLE: Grados de libertad del error

Teniendo en cuenta que hay diferencia altamente significativa entre el factor (a) fotoperíodo, tenemos:

$$S(x) = \frac{1287.33}{10} = 11.3460 \quad \text{GLE : 9}$$

RES: Rangos estudentizados significativos

RMS: Rangos mínimos significativos

P: No de medias para rangos probados

P 2
RES 3.20
RMS36.3073

- Ordenar las medias de menor a mayor

F 16	F 8
369.7	3051.8

- Probar las diferencias

$$|3051.8 - 369.7| = 2682.09 > 36.3073 \quad \text{Significativamente diferentes}$$

Teniendo en cuenta que hay diferencia altamente significativa entre el factor (b) concentración de sacarosa, tenemos:

$$S(x) = \frac{2239.61}{10} = 14.9653 \quad \text{GLE : 36}$$

RES: Rangos estudentizados significativos

RMS: Rangos mínimos significativos

P: No de medias para rangos probados

P	2	3
RES	2.89	3.01
RMS	43.2497	45.0456

- Ordenar las medias de menor a mayor

(30g/L) b ₁	(60g/L) b ₂	(90g/L) b ₃
405	939.9	2076.6

- Probar las diferencias

$$|2076.6 - 405| = 1671.6 > 45.0456 \quad \text{Significativamente diferentes}$$

$$|2076.6 - 939.9| = 1136.7 > 43.2497 \quad \text{Significativamente diferentes}$$

$$|939.9 - 405| = 534.9 > 43.2497 \quad \text{Significativamente diferentes}$$

ANEXO E. ANALISIS DE VARIANZA Y COMPARACION MULTIPLE EXPERIMENTO 2

• NUMERO DE MICROTUBERCULOS POR EXPLANTES QUE TUBERIZO

Análisis de varianza de Número de explantes que tuberizaron. Experimento 2.

FUENTE	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
A (FOTOPERIODO)	1	0.2	0.2	0.3292ns	5.12	10.56
Error	9	5.4666	0.6074			
Total parcela	19					
B (SACAROSA)	2	5.7333	2.8666	13.8216 **	3.26	5.25
AB	2	7.4667	0.2074	4.58*	3.26	5.25
Error	36	80626.2	2239.61			
Subtotal subparcelas	40					
TOTAL	59					
C (ABA)	2	0.1	0.05	0.1709ns	3.09	4.82
AC	2	0.6333	0.3166	1.0823ns	3.09	4.82
BC	4	0.8667	0.2116	0.7234ns	2.46	3.51
ABC	4	6.1667	1.5416	5.2704 **	2.46	3.51
Error	108	31.6	0.2925			
Subtotal	120					
Total subsubparcelas	179					

** : Diferencia altamente significativa

* : Diferencia significativa

ns: No hay diferencia significativa

PRUEBA DE DUNCAN

- Error estándar S(x)

$$S(x) = \frac{CME}{r}$$

r: No de repeticiones

CME: Cuadrado medio del error

GLE: Grados de libertad del error

Teniendo en cuenta que hay diferencia altamente significativa entre el factor (b) concentración de sacarosa, tenemos:

$$S(x) = \frac{0.2074}{10} = 0.1440 \quad \text{GLE : 36}$$

RES: Rangos estudentizados significativos

RMS: Rangos mínimos significativos
 P: No de medias para rangos probados

P	2	3
RES	2.89	3.01
RMS	0.4162	0.4334

- Ordenar las medias de menor a mayor

(30g/L) b ₁	(90g/L) b ₃	(60g/L) b ₂
18	28	44

- Probar las diferencias

|44 - 18| = 26 > 0.4334 Significativamente diferentes

|44 - 28| = 16 > 0.4162 Significativamente diferentes

|28 - 18| = 10 > 0.4162 Significativamente diferentes

- **NUMERO DE MICROTUBERCULOS POR EXPLANTES QUE TUBERIZO**

Análisis de varianza del número de microtubérculos por explantes. Experimento 2.

FUENTE	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
A (FOTOPERIODO)	1	1.4223	1.4223	0.9521ns	5.12	10.56
Error	9	13.4444	1.4938			
Total parcela	19					
B (SACAROSA)	2	18.7445	9.3722	10.3434 **	3.26	5.25
AB	2	8.611	4.3055	4.75*	3.26	5.25
Error	36	32.6223	0.9061			
Subtotal subparcelas	40					
TOTAL	59					
C (ABA)	2	0.8112	0.4056	0.4341ns	3.09	4.82
AC	2	1.8777	0.9388	1.0049ns	3.09	4.82
BC	4	1094.78	273.695	0.1457ns	2.46	3.51
ABC	4	4.1555	1.0388	1.1119*	2.46	3.51
Error	108	100.9001	0.9342			
Subtotal	120					
Total subsubparcelas	179					

** : Diferencia altamente significativa

* : Diferencia significativa
 ns: No hay diferencia significativa

PRUEBA DE DUNCAN

- Error estándar $S(x)$

$$S(x) = \frac{CME}{r}$$

r: No de repeticiones

CME: Cuadrado medio del error

GLE: Grados de libertad del error

Teniendo en cuenta que hay diferencia altamente significativa entre el factor (b) concentración de sacarosa, tenemos:

$$S(x) = \frac{0.9061}{10} = 0.3010 \quad \text{GLE : 36}$$

RES: Rangos estudentizados significativos

RMS: Rangos mínimos significativos

P: No de medias para rangos probados

P	2	3
RES	2.89	3.01
RMS	0.8699	0.9060

- Ordenar las medias de menor a mayor

(30g/L) b_1	(90g/L) b_3	(60g/L) b_2
21	34	67

- Probar las diferencias

$$|67 - 21| = 46 > 0.9060 \text{ Significativamente diferentes}$$

$$|67 - 34| = 33 > 0.8699 \text{ Significativamente diferentes}$$

$$|34 - 21| = 13 > 0.8699 \text{ Significativamente diferentes}$$

- PESO PROMEDIO DE MICROTUBERCULOS POR EXPLANTES QUE TUBERIZO**

Análisis de varianza del peso promedio de microtubérculos por explantes.
Experimento 2

FUENTE	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
A (FOTOPERIODO)	1	12313.7	12313.7	3.55ns	5.12	10.56
Error	9	31209.09	3467.67			
Total parcela	19					
B (SACAROSA)	2	14216.61	7108.30	2.97ns	3.26	5.25
AB	2	15794.31	7897.30	3.30*	3.26	5.25
Error	36	86063.71	2390.65			
Subtotal subparcelas	40					
TOTAL	59					
C (ABA)	2	627.24	313.62	0.158ns	3.09	4.82
AC	2	447.41	223.70	0.112ns	3.09	4.82
BC	4	11849.54	2962.38	1.495ns	2.46	3.51
ABC	4	27215.63	6803.90	3.435*	2.46	3.51
Error	108	213898.25	1980.53			
Subtotal	120					
Total subsubparcelas	179					

- BIOMASA TOTAL DE MICROTUBERCULOS POR EXPLANTE**

Análisis de varianza de la biomasa total de microtubérculos por explantes.
Experimento 2

FUENTE	GL	SC	CM	Fc	Ft	
					5%	1%
A (FOTOPERIODO)	1	30008	30008	20.36 **	5.12	10.56
Error	9	13263.73	1473.74			
Total parcela	19					
B (SACAROSA)	2	53645.46	26822.73	6.73 **	3.26	5.25
AB	2	24642.03	12321.01	3.07ns	3.26	5.25
Error	36	143383.35	3982.86			
Subtotal subparcelas	40					
TOTAL	59					
C (ABA)	2	3126.67	1581.33	0.47ns	3.09	4.82
AC	2	3127.36	1563.68	0.46ns	3.09	4.82
BC	4	21539.56	5384.89	1.60ns	2.46	3.51
ABC	4	64030.90	16007.72	4.78*	2.46	3.51
Error	108	361665.1	3348.75			
Subtotal	120					
Total subsubparcelas	179					

** : Diferencia altamente significativa
 * : Diferencia significativa
 ns: No hay diferencia significativa

PRUEBA DE DUNCAN

- Error estándar $S(x)$

$$S(x) = \frac{CME}{r}$$

r: No de repeticiones

CME: Cuadrado medio del error

GLE: Grados de libertad del error

Teniendo en cuenta que hay diferencia altamente significativa entre el factor (a) fotoperiodo, tenemos:

$$S(x) = \frac{1473.74}{10} = 38.3845 \quad \text{GLE : 9}$$

RES: Rangos estudentizados significativos

RMS: Rangos mínimos significativos

P: No de medias para rangos probados

P 2
 RES 3.20
 RMS122.8305

- Ordenar las medias de menor a mayor

F 16	F 8
3488.7	1164.6

- Probar las diferencias

$$|3488.7 - 1164.6| = 2324.1 > 122.8305 \text{ Significativamente diferentes}$$

Teniendo en cuenta además que hay diferencia altamente significativa entre el factor (b) concentración de sacarosa, tenemos:

$$S(x) = \frac{3982.86}{10} = 6.2678 \quad \text{GLE : 36}$$

P 2	3
RES 2.89	3.01
RMS18.1140	18.8662

- Ordenar las medias de menor a mayor

(30g/L) b_1	(90g/L) b_3	(60g/L) b_2
385.7	1365.2	2902.4

- Probar las diferencias

$$|2902.4 - 385.7| = 2516.7 > 18.8662 \text{ Significativamente diferentes}$$

$$|2902.4 - 1365.2| = 1537.2 > 18.1140 \text{ Significativamente diferentes}$$

$$|1365.2 - 385.7| = 979 > 18.1140 \text{ Significativamente diferentes}$$