

**DESARROLLO DE METODOLOGIAS PARA EL ENRAIZAMIENTO
IN VITRO DE *Dioscorea cayenensis* Cv “Ñame Amarillo” Y SU
ACLIMATACIÓN A CONDICIONES *IN VIVO***

**ALBERTO JONATHAN GARRIDO CORREA
HUMBERTO ESTEBAN BENITEZ CALDERIN
MARIA LUISA FUENTES FUENTES**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGIA
SINCELEJO-SUCRE**

2005

**DESARROLLO DE METODOLOGIAS PARA EL ENRAIZAMIENTO *IN*
VITRO DE *Dioscorea cayenensis* Cv “Ñame Amarillo” Y SU
ACLIMATACIÓN A CONDICIONES *IN VIVO***

**ALBERTO JONATHAN GARRIDO CORREA
HUMBERTO ESTEBAN BENITEZ CALDERIN
MARIA LUISA FUENTES FUENTES**

**Director:
Ph. D. JAVIER DARIO BELTRAN**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA CON ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGIA
SINCELEJO-SUCRE
2005**

**“Únicamente los autores son responsables de las ideas expuestas
en el presente trabajo”**

(Artículo 12, resolución 02 del 2003)

TABLA DE CONTENIDO

Pag.

RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN.....	7
2. OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
3. ESTADO DEL ARTE	10
3.1 JUSTIFICACIÓN.....	10
4. MARCO TEÓRICO	12
4.1 GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>Dioscorea</i>	12
4.2 TAXONOMIA.....	14
4.4 DISTRIBUCIÓN DEL CULTIVO DE ÑAME	15
4.5 COMPONENTE BIOTECNOLÓGICO EN EL CULTIVO DE ÑAME.....	17
4.6 SUSTANCIAS QUE INTERVIENEN EN EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO VEGETAL.....	18
4.7 DEFINICIÓN, BIOSÍNTESIS Y EFECTOS CARACTERÍSTICOS DE LAS AUXINAS.....	19
4.8 TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Dioscorea</i> spp.....	21
4.9 PROPIEDADES FÍSICAS DE UN SUBSTRATO	24
4.10 POSIBILIDAD DE ABSORCIÓN DE AGUA POR PARTE DE LAS RAÍCES.....	25
5. DISEÑO EXPERIMENTAL	28
5.1 LOCALIZACIÓN	28
5.2 FASE DE ENRAIZAMIENTO	28
5.3 FASE DE ACLIMATACIÓN.....	29
6. METODOLOGÍA	31
6.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRES.....	31
6.2 SELECCIÓN DE LA PLANTA MADRE.....	32
6.3 FASE DE DESINFECCIÓN.....	32
6.4 FASE DE INICIACIÓN.....	33

6.5 FASE DE MULTIPLICACIÓN	34
6.6 FASE DE ENRAIZAMIENTO.....	35
6.7 FASE DE ACLIMATACIÓN <i>IN VIVO</i>	36
<u>7. RESULTADOS</u>	<u>38</u>
7.1 FASE DE ENRAIZAMIENTO.....	38
7.2 FASE DE ACLIMATACIÓN	43
7.3 ENSAYO DE ACLIMATACIÓN CON RAÍCES TIPO A.	48
7.4 ENSAYO DE ACLIMATACIÓN CON RAÍCES TIPO B.	52
<u>8. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</u>	<u>57</u>
8.1 FASE DE ENRAIZAMIENTO.....	57
8.2 FASE DE ACLIMATACIÓN	59
<u>9. CONCLUSIONES</u>	<u>62</u>
<u>10. RECOMENDACIONES</u>	<u>64</u>
<u>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</u>	<u>66</u>
<u>ANEXOS.....</u>	<u>73</u>

RESUMEN

La costa atlántica colombiana es una región productora de ñame por excelencia, y dada la gran demanda de los mercados internacionales por *Dioscorea cayenensis* y su alto precio, convierten a este tipo de ñame en un producto con gran potencial económico para esta zona del país. Es por esto que el desarrollo de sistemas de producción masiva de plantas, como los sistemas de cultivo *in vitro*, ofrecen una alternativa limpia para producir material de optima calidad, supliendo la demanda de semilla sana. A partir de plantas en invernadero, se obtuvieron segmentos nodales de *D. cayenensis* Cv "Ñame Amarillo", los cuales se establecieron y multiplicaron hasta un tercer subcultivo en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Universidad de Sucre, siguiendo el protocolo propuesto por Pérez y Brun en el 2003. Las plántulas obtenidas fueron enraizadas en medio MS (Murashige y Skoog) sólido, suplementado con 100 mg/L de mioinositol, 0.1 mg/L de tiamina-HCl, 30 g/L de sacarosa, 7 g/L de agar, 1 g/L de carbón activado, evaluando diferentes concentraciones de los reguladores de crecimiento ácido indol-acético (AIA), ácido indol-butírico (AIB), ácido naftalen-acético (ANA) y ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D), e incubados en cuarto de crecimiento a 27°C, con fotoperíodo de 12 horas, con diferentes intensidades lumínicas, como resultado se obtuvo un promedio total de 30,18 raíces por planta, con una longitud promedio de raíces primarias de 8,23 cm, al igual que un promedio de hojas nuevas y numero de nudos nuevos de 3,43 y 3,33 respectivamente. El ANAVA no mostró diferencia significativa entre los tratamientos con reguladores de crecimiento, pero se observó diferencia estadística significativa al 5% entre los bloques, siendo el bloque expuesto a una intensidad lumínica promedio de $4,3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ el que ofreció los valores promedio mas favorables para las variables en estudio. El proceso de aclimatación *in vivo* de *vitro* plantas de *Dioscorea cayenensis*, no se ve influenciado de manera diferencial por la presencia o ausencia de inóculos de hongos micorizógenos MYCORAL®, pero sí por el desarrollo de estas plantas en un micro ambiente tapado, con diferencia estadística significativa al 1% para el tamaño de las plantas, 0.1 % para el numero de hojas nuevas y 5% para el numero de hojas muertas, según el análisis de varianza. El porcentaje de supervivencia de las plántulas en un micro ambiente tapado fue del 96.6%.

ABSTRACT

The Colombian Atlantic coast is by excellence a production region of yam, by greast inquiry of internationals markets and high cost of *D. cayenensis*, wich convert in an economic potential eminent. To this region and to nation, is by this that production systems development a masse of plant such as *in vitro* culture systems wich propose clean alternative of material produce at optims quality to supplies of healthy seeds demand. Beginning with stablisheds plants in green-house was obtained nodals segments of *D. cayenensis* cv "yellow yam", wich establishment a multiplied as to third subculture in the tissue plant culture laboratory of Sucre's University by means protocols proposed by Perez and Brun (2003). These plants was settled roots in M.S. medium supplement with myo-inisitol 100 mg/L, tyamine 0.1 mg/L, sucrose 30 g/L, agar 7 g/L, active carbon 1 g/L, and differents concentrations of growth regulators such as IAA, IBA, NAA and 2,4-D. incubates in growing room at 27°C with 12 hours of fotoperiod at differents luminic intensities, was obtained an mean total of 30.18 roots by plant, and mean length the primary roots of 8.23 cm, as mean new leaf as buds of 3.43 and 3.33 respectively. The ANAVA not was showed significatives differences inner treatments, but observed an stadistical significative differences in the blocks of 5% so that block with mean luminic intensities of $4,3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ was showed average values more favourable to variables in study. The acclimatization process of vitroplants of *D. cayenensis* not was influenced by differential manner by absence or presence of inoculeds mycorizogens fungi (MYCORAL®), but if heather development this plants in a closed micro environment with significatives differences of 1% to size of plants, 0.1% to new leafs numbers and 5% to leaves number according variance analysis. The percentage survival plantless in the microenvironment was 96%.

INTRODUCCIÓN

En el ámbito mundial se han caracterizado más de 650 especies de ñame (*Dioscorea spp.*), nombre común de los miembros de un género de herbáceas vivaces monocotiledóneas originarias de las regiones tropicales. Solo 12 especies de ñame son cultivadas con algún interés comercial (Thurston, 1998). El ñame es cultivado por los tubérculos comestibles que forma, que pueden alcanzar hasta 2,5 m de longitud y 45 kg de peso.

El ñame es una especie que reviste gran importancia para la alimentación humana por su alto valor nutricional, principalmente en África, algunos países de Asia y de América, (Ammirato, 1984. y Coursey y Coursey, 1971) incluyendo Colombia. Además, a partir de sus tubérculos se pueden obtener metabolitos secundarios que actúan como precursores de compuestos esteroideos (Applezwig, 1997). Esto ha despertado gran interés para su comercialización y exportación a países de Europa y a Estados Unidos principalmente. Sin embargo, el cultivo de ñame se ha visto amenazado por la presencia de patógenos como los virus, bacterias, hongos y nemátodos que ponen en peligro la producción de ñame de alto rendimiento (Osorio y Ramírez, 1989).

En los últimos años, con el avance de la biotecnología aplicada a la agricultura, y la utilización de los sistemas de propagación *in vitro*, se han obtenido grandes volúmenes de plantas de ñame de buena calidad, convirtiéndose en alternativas para la obtención masiva de semillas, que en combinación con los métodos tradicionales de siembra en el vivero o campo, permite a los productores reducir costos de producción (Corporación Colombia Internacional, 1999) y suplir en parte las deficiencias en la producción de semilla para el cultivo de ñame.

Para la región Caribe colombiana, *Dioscorea cayenensis* Cv "ñame

amarillo” se convierte en un producto con gran potencial de producción y exportación, superior a de las especies de ñame más cultivadas (*Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata*), por su alta demanda en el mercado internacional. Empresas como C.I. LALVI & CIA. LTDA. lo requieren para suplir el alto consumo humano y como materia prima para la extracción de almidón, harina, obtención de sapogeninas esferoidales, como la hecogenina, digitogenina y diosgenina, las cuales se utilizan en la industria farmacéutica para elaborar compuestos esteroideos que actúan como hormonas y sus derivados, incluyendo las hormonas sexuales, la cortisona y las píldoras anticonceptivas (Applezwrig, 1997). Posee, además, una característica fisiológica deseable en el proceso de almacenaje del tubérculo, pues si éste presenta algún daño causado por nemátodos, hongos o bacterias, se puede escindir la zona afectada sin riesgo a que se deteriore el resto del tubérculo (Venegas, 2002).

A pesar de los avances en el campo de la biotecnología agrícola en la costa atlántica colombiana, impulsados por la Universidad de Sucre y otras instituciones en materia de producción de plantas *in vitro* de ñame, en la actualidad para *Dioscorea cayenensis* no se cuenta con estudios en aras de optimizar la fase de enraizamiento de *in vitro* plantas, la cual se hace estrictamente necesaria para su consecuente fase de aclimatación en vivero, que constituye un paso de extrema importancia para garantizar la supervivencia de dichas plantas en condiciones de cultivo en campo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología para el adecuado enraizamiento *in vitro* de *Dioscorea cayenensis* cv “ñame amarillo” a partir de segmentos nodales y su aclimatación a condiciones *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar los requerimientos adecuados de los reguladores de crecimiento, Ácido Indolacético (AIA), Ácido Indolbutírico, (AIB), Ácido Naftalenacético (ANA) y Ácido 2,4 Dicloro fenoxiacético (2,4-D), para producir plántulas de *Dioscorea cayenensis* cv “ñame amarillo” con una arquitectura aérea y radicular que favorezca su establecimiento *in vivo*.
- Evaluar el efecto de sustratos inoculados y no inoculados con hongos micorrizógenos, así como el efecto de ambientes distintos (tapado y destapado) en la aclimatación de *in vitro* plantas de *Dioscorea cayenensis* cv “ñame amarillo”, producidas en el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad de Sucre.

3. ESTADO DEL ARTE

3.1 Justificación

El ñame es un cultivo tradicional ligado a la economía y a la cultura de los habitantes de la Costa Atlántica colombiana. Amplios sectores campesinos de los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, Atlántico y Magdalena se dedican al cultivo del ñame (*Dioscorea sp.*) en pequeñas parcelas, con el fin de autoabastecerse y comercializar los excedentes en los mercados nacionales e internacionales (Ministerio de Agricultura, 1977).

La demanda interna y las perspectivas de mercado externo, provocan un aumento exagerado en el área cultivada de ñame (*Dioscorea ssp.*), pero la presencia de patógenos sistémicos y enfermedades como la antracnosis afectan la producción de ñame y la obtención de semillas sanas y de buena calidad para su cultivo y comercialización, lo cual creó un gran impacto negativo en lo económico y social.

Dioscorea cayenensis cv “ñame amarillo” es un tubérculo ampliamente cultivado en Jamaica, Haití y en el norte y sudeste de África, siendo muy apetecido en los mercados internacionales, en donde supera en precio hasta en un 100% a otras especies de ñame, principalmente en Estados Unidos (Today's Market Prices, 2002). Debido a la carencia de investigaciones locales en *D. cayenensis*, se hace necesaria la implementación y el uso de técnicas biotecnológicas aplicadas a la agricultura tales como la estandarización de medios de cultivo *in vitro* para el enraizamiento de vitroplantas de *Dioscorea cayenensis* cv “ñame amarillo” y su aclimatación *in vivo*, que permitan mejorar la producción de semillas de alta calidad y a gran escala, en un período de tiempo relativamente corto y de forma eficiente y económica.

El enraizamiento *in vitro*, es un paso importante antes de llevar las nuevas plantas al ambiente de cultivo en campo, debido a que es en este paso donde se dotan a las *in vitro* plantas de una estructura radicular adecuada, con la cual sean capaces de realizar sus actividades vitales autónomas una vez que se encuentren en el medio natural. Pero antes se hace necesaria una fase de endurecimiento del material vegetal, la cual es un punto crucial y definitivo dentro del proceso de adaptación de las *in vitro* plantas a nuevos ambientes.

Uno de los obstáculos para aclimatar diferentes especies de ñame provenientes de sistemas *in vitro*, es el desconocimiento de metodologías ajustadas a las condiciones tropicales, ya que se tienen muy pocas referencias de trabajos realizados en el país, lo cual repercute, desde el punto de vista técnico y económico, en una nula o baja eficiencia en el número de plántulas a producir. Este proceso debe tener la mayor eficiencia en la fase de establecimiento en condiciones de invernadero (casa malla), para poder reducir los niveles de mortalidad y mejorar el endurecimiento de las plantas, de forma tal que no reduzcan su crecimiento y desarrollo, permitiendo así llevar plantas sanas y vigorosas al campo (Aguas, et. al., 2000)

Por todo lo anterior, Pérez y Brun (2003), quienes lograron estandarizar medios de cultivo *in vitro* para la propagación masiva de *Dioscorea cayenensis*, en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad de Sucre, recomiendan realizar estudios encaminados a la optimización de un medio que garantice el adecuado enraizamiento *in vitro*.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Generalidades del género *Dioscorea*

El género *Dioscorea* posee más de 650 especies distribuidas en las regiones tropicales de alta pluviosidad (Thurston, 1998). Las plantas pertenecientes a este género, se caracterizan por poseer tubérculos llamados ñames. Estos tubérculos contienen fécula abundante y tienen la capacidad de formar su sistema caulinar a partir de una capa de células meristemáticas localizadas en la corteza, lo cual es aprovechado para su propagación vegetativa a partir de secciones del tubérculo (Acosta, 1980).

El ñame es una planta monocotiledónea con características de dicotiledónea; su tallo es herbáceo y de hábito trepador y puede alcanzar varios metros de longitud, pero demasiado débil para soportar su propio peso, por lo cuál requiere de un buen tutor para su óptimo crecimiento; en general, sus hojas son de forma acorazonada, soportadas por un largo pecíolo, se disponen de manera opuesta y/o alterna en la misma planta (Montaldo, 1983). Las raíces que se originan del tubérculo, son resistentes, fuertes y fibrosas, se localizan en su mayoría a 30 centímetros de la superficie y pueden llegar hasta un metro de profundidad. Algunas especies poseen raíces aéreas, otras tienen espinas en sus raíces (Charles y Onwbeme, 1994). El ñame es una planta dioica con flores imperfectas producidas en diferentes plantas: masculinas y femeninas (Ammirato, 1984), sus flores son pequeñas en forma de racimos, espigas o panículas, unisexuales con tres sépalos y tres estambres. En casi todas las especies cultivadas, la floración es muy escasa (Acosta, 1980). En su mayoría son polinizadas por insectos. Los frutos son cápsulas dehiscentes, secas de 1 a 3 centímetros de longitud,

cuando están maduros se dividen y liberan la semilla dispersándola, éstas son pequeñas. Los embriones son muy pequeños y están rodeados de un endospermo, las semillas tienen una dormancia de 3 a 4 meses después de la senescencia de la planta y germinan después de 3 semanas de plantadas. Algunas especies poseen bulbillos que se desarrollan en las axilas de las hojas, tienen forma y tamaño variable, pueden ser angulares, esféricos o redondos y pesar varios gramos hasta kilogramos. Fisiológicamente son iguales a los tubérculos y se pueden utilizar para la propagación (Charles y Onwbeme, 1994).

El género *Dioscorea* ha sido dividido en varias secciones dentro de las cuales sobresalen: *Combillium*, *Lassiophyton*, *Osophyton*, *Macrogynodium* y *Enantiophyllum*. En ésta última sección se encuentra ubicada *D. alata* al igual que *D. cayenensis*, también conocida como *Dioscorea cayenensis* Lam “Guinea amarillo” ó “espino” y es muy cultivada en África occidental y algo en América tropical, siguiendo en importancia mundial a *D. alata*. Se encuentra adaptada a partes altas con suelos arcillosos y es una especie polimorfica. Los miembros de ésta especie tienen tallo cilíndrico o redondos de color verde oscuro, espinosos y se enrollan a la derecha (dextrógiro), hojas numerosas, más pequeñas y brillantes que las de *D. alata*, simples, enteras, opuestas o alternas y acorazonadas. (Acosta, 1980).

En nuestro medio las variedades más importantes son: “el ñame chingola”, “el ñame espino” y el “ñame espino de Guinea”. Algunas veces *D. cayenensis* es sinónimo de *D. rotundata* poir, ya que dentro de esta última hay algunas variedades que no toleran la sequía, poseen pulpa amarilla, y periodo vegetativo muy corto y son menos resistentes a los recalentamientos del suelo, razón por la cual deben usar tutores, cualidades que son propias de *D. cayenensis*. (Acosta, 1980).

4.2 Taxonomía

La ubicación taxonómica del ñame es:

División: Espermatofita

Subdivisión: Angiosperma

Clase: Monocotiledónea

Orden: Dioscoreales

Familia: Dioscoreaceae

Género: *Dioscorea*

Especie: varias, entre las cuales se encuentra *cayenensis*
(Acosta, 1980)

4.3 Importancia

Los tubérculos de ñame contienen abundante fécula y constituyen un importante alimento en las regiones tropicales donde se cultiva por ser una excelente fuente de carbohidratos y minerales como calcio, hierro y fósforo (Ammirato, 1983). Aporta hasta un 12% de los recursos energéticos para los habitantes de regiones caribeñas y africanas, es rico en vitaminas tales como ácido ascórbico, riboflavinas, tiamina y pro vitamina A (Perea y Buitrago, 2000). Además, poseen la mayor parte de los aminoácidos esenciales: arginina, serina, asparagina, glicina, glutamina, isoleucina, y valina, y en menor cantidad: histidina, metionina, triptofano y lisina (Asiedu, 1986 y Abang, 2003).

Los tubérculos de *Dioscorea spp.* son ricos en dioscorina, una proteína soluble presente específicamente en las vacuolas de las células del tubérculo, que por su abundancia se considera como proteína de almacenaje (Conlan, et. al., 1998). A partir de los tubérculos de ñame, se

pueden obtener también metabolitos secundarios como las sapogeninas esteroidales, precursoras importantes en la síntesis de compuestos esteroidales (Appelzweig, 1997). (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de 100 g de materia seca del tubérculo de ñame, según varios autores.

Componente	Unidad	Collazos et. al., (1975)	Jacoby1/ (1975)	Montaldo (1975)
Agua	g	72,2	72,4	72,6
Calorías	Cal	112,0	105,0	100,0
Proteína	g	1,8	2,4	2,0
Grasas	g	1,5	0,2	0,2
Carbohidratos	g	23,5	24,1	24,3
Fibra	g	0,4	--	0,6
Ceniza	g	1,0	--	0,9
Calcio	mg	3,0	22,0	14,0
Fósforo	mg	30,0	--	43,0
Hierro	mg	0,7	0,8	1,3
Vitaminas	mg	--	--	--
Tiamina	mg	0,09	0,09	0,13
Riboflavina	mg	0,03	0,03	0,02
Niacina	mg	0,44	0,50	0,40
Ácido ascórbico	mg	3,10	10,00	3,00

Fuente: Citado por Pinedo (1975).

4.4 Distribución del cultivo de ñame

Las especies más cultivadas del género *Dioscorea* corresponden a *D. alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. esculenta*, *D. bulbifera* y *D. trifida*. El área mundial cultivada comprende tres regiones principales: África Occidental, sur de Asia incluyendo parte de China y Japón, Oceanía y los países del Caribe (Ammirato, 1984).

La producción de ñame en el mundo se ha estimado en 34 millones de toneladas por año, de las cuales, el 95 % proviene del continente africano (FAO, 1996). Nigeria, con el 73% de la producción mundial, ocupa el primer lugar. En América los principales productores y comercializadores de ñame son: Brasil, Colombia, Haití, Costa Rica, Jamaica y Panamá, alcanzando precios en el mercado norteamericano (Atlanta, Los Ángeles, Boston, Miami, Baltimore, New York, San Francisco, Chicago y Philadelphia entre 14.00 y 24.00 US por caja de 40 libras para *Dioscorea rotundata* y para *Dioscorea cayenensis* entre 35.00 y 46.00 US por caja de 45 libras en temporada de baja oferta (Today's Market Prices, 2002).

En Colombia se cultivan varias especies de ñame: ñame criollo (*D. alata*), ñame espino (*D. rotundata* Poir), ñame papa (*D. bulbifera* Burkill), ñame azúcar (*D. esculenta*) y ñampín (*D. trifida* L), de las cuales *D. alata* y *D. rotundata* son las especies de mayor importancia tanto por el área de siembra como por la demanda del tubérculo, seguidas por *D. trifida* (Álvarez, 2000).

La Costa Atlántica abarca la mayor producción de ñame del país, siendo las áreas de mayor cultivo: la zona costera del departamento de Córdoba, la subregión natural de los Montes de María en los departamentos de Sucre y Bolívar, y algunos municipios de los departamentos del Cesar y La Guajira, alcanzándose una producción entre los años 1999 y 2000 de 254.849 toneladas sobre las 23.039 hectáreas sembradas para un rendimiento de 11.062 Kg/Ha (URPAS, 2001) (Tabla 2).

Tabla 2. Participación sobre la producción nacional de ñame año 2000.

DEPARTAMENTO	PARTICIPACIÓN %
Córdoba	40.2
Bolívar	39.2
Sucre	12.4
Cesar	4.3
Antioquia	1.8
Otros	2.0
Total	100

Fuente: Evaluaciones Agropecuarias, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Dirección de Política Social. URPAS, UMATAS, 2001.

4.5 Componente biotecnológico en el cultivo de ñame

La producción convencional de ñame en la Costa Atlántica colombiana se realiza con muy poca tecnología, lo que incrementa costos, reduce la producción y contribuye a la persistencia de los problemas fitosanitarios. Actualmente para contrarrestar estos aspectos, los trabajos de investigación participativa que se realizan a través del Programa de Biotecnología Agrícola Holanda-Colombia del cual forman parte la Universidad Nacional, la Universidad de Córdoba y la Universidad de Sucre y CORPOICA, han permitido el desarrollo masivo de plantas, utilizando técnicas biotecnológicas (Corporación Colombia Internacional, 1999).

La Biotecnología constituye el conjunto de sistemas que permiten la

manipulación de microorganismos, células y tejidos en condiciones controladas y totalmente asépticas. La aplicación de los sistemas *in vitro* contribuye así a la solución de problemas agrícolas (Perea y Buitrago, 2000).

4.6 Sustancias que intervienen en el crecimiento y desarrollo vegetal.

Los cambios que sufre la planta al pasar el tiempo están determinados tanto por factores internos heredados como por factores ambientales. Cuando se habla de desarrollo vegetal se distinguen tres niveles de control: intracelular, que depende de la expresión de los genes por acción de las enzimas, intercelular, que se refiere a las correlaciones e interacciones de las células y depende de las hormonas y un tercer nivel que depende de los estímulos que ejercen las condiciones ambientales (Torrey, 1967).

Las hormonas vegetales son aquellas sustancias sintetizadas en un determinado lugar de la planta y se translocan a otro, donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento-desarrollo o metabolismo vegetal. El término sustancias reguladoras de crecimiento o fitoreguladores, es más general y abarca a las sustancias tanto de origen natural como sintéticas, que determinan respuestas a nivel de crecimiento, metabolismo o desarrollo de la planta. Los reguladores de crecimiento más utilizados en los procesos *in vitro* son las auxinas y las citoquininas (González, et. al., 1999).

El descubrimiento de las auxinas trajo consigo una serie de estudios y trabajos. El holandés Fritz Went dio el primer paso al descubrir sustancias que actuaban sobre el enraizamiento. Otros investigadores como Timan (1937) realizaron estudios con estas sustancias, a las cuales se les denominó como ANA y AIB (auxinas), descubriendo que éstas se

encuentran en diferentes concentraciones dentro de la planta y concluyó que la raíz trabaja a concentraciones muy bajas de auxinas. Las auxinas ayudan al crecimiento radicular hasta cierto máximo de concentración, ya que se pueden volver tóxicas a concentraciones elevadas. Esta toxicidad generalmente ocurre entre los 25 a 50 mg/l.

Tras el descubrimiento del AIA, se pensó que, si una estructura tan simple era capaz de producir respuestas tan notables sobre el crecimiento, tendría que haber más compuestos con propiedades análogas. Muchos investigadores comenzaron a ensayar diferentes moléculas para ver si tenían las propiedades descritas para el AIA, y así, se descubrió que también eran capaces de favorecer el crecimiento de las células el ácido indenoacético, el ácido 2-benzofuranacético, el ácido 3-benzofuranacético, el ácido naftalenacético y una serie de compuestos relacionados.

Posteriormente, se vio que otros compuestos que poseían anillo indólico también resultaban activos, como el ácido 3-indolpirúvico, y el ácido indolbutírico, derivados del naftaleno como el ácido naftil-1-acético y el ácido naftoxi-2-acético. Por último, el hecho de que algunos ácidos fenoxiacéticos tenían actividad auxínica llevó al descubrimiento del 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) con una gran actividad. A partir de aquí se desarrolló una amplia gama de moléculas con actividad auxínica, como el ácido 2-metil, 4-cloro fenoxiacético (MCPA) y el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ambos con propiedades herbicidas cuando se emplean a concentraciones elevadas y utilizados como armas químicas en la guerra de Vietnam.

4.7 Definición, Biosíntesis y Efectos Característicos de las Auxinas.

El nombre auxina significa en griego crecer y es dado a un grupo de compuestos que estimulan la elongación celular de las plantas. El ácido

indolacético (AIA) es la forma predominante, aunque se ha evidenciado la presencia de otras auxinas indólicas naturales en las plantas (González, et. al., 1999).

Las auxinas son biosintetizadas a partir del aminoácido triptófano en 4 diferentes rutas: ruta del ácido indolpirúvico, de la triptamina, de la indolacetoxima y de la indolacetamida. Aún no se sabe con exactitud el tejido u órgano responsable de la biosíntesis de auxinas en condiciones naturales. Existen ciertas hipótesis sobre la biosíntesis de auxinas, las cuales hacen referencia a la muerte celular, la cual trae como consecuencia la liberación de triptófano por autólisis de proteínas, lo cual incrementa la concentración de triptófano en el medio y se da la síntesis de AIA.

Los reguladores de crecimiento, y en la planta las auxinas, son sustancias mensajeras que son activas a muy bajas concentraciones (en su mayoría), siendo los lugares de síntesis y de acción casi siempre distintos. Están implicadas en la regulación de numerosos procesos fisiológicos: promueven el crecimiento y diferenciación celular y por ende el crecimiento en longitud de la planta, controlan la iniciación de la radícula y de las raíces adventicias, estimulan la floración, el crecimiento y maduración de frutos, la senectud, el geotropismo. Se dirigen a la zona oscura de la planta, produciendo que las células crezcan más que las correspondientes células que se encuentran en la zona clara, lo que produce una curvatura de la planta hacia la luz, movimiento que se conoce como fototropismo, retardan la caída de hojas, flores y frutos jóvenes. El efecto inicial preciso de la hormona que subsecuentemente regula este arreglo diverso de eventos fisiológicos no es aún conocido (González, et. al., 1999).

En general, las auxinas que han demostrado mayor efectividad para inducir enraizamiento son el ácido indolbutírico (AIB) y el ácido

naftalenacético (ANA). El AIB se ha utilizado desde 1930 por los propagadores de plantas para el enraizamiento de estacas (Rojas y Ramírez, 1993). Se ha observado también que para la inducción de la radícula, es mejor utilizar preparaciones de auxinas en agua, ya que las preparaciones en alcohol resultan tóxicas y pueden quemar el material vegetal.

Durante la formación de raíces adventicias en tallos tratados con auxinas, las células inicialmente se dividen en forma desorganizada para dar lugar a una masa de tejido que semeja un tumor y que recibe el nombre de callo. Después se forman los primordios radiculares organizados dentro del callo.

Se han propuesto varios mecanismos acerca de la acción de las auxinas sobre los ácidos nucleicos: uno de ellos supone que el AIA actúa en la traducción del mensaje, sobre el enlace del aminoácido con el ATP que lo activa para unirse al RNA mensajero. Las evidencias experimentales apoyan la idea que el AIA promueve o reprime la síntesis de fracciones del RNA mensajero por un mecanismo aún no conocido (Zurfluh y Guilfoyle, 1982). Durante la elongación celular inducida por la auxina se piensa que actúa por medio de un efecto rápido sobre el mecanismo de la bomba de protones ATP-asa en la membrana plasmática, y un efecto secundario mediado por la síntesis de enzimas (González, et. al., 1999).

4.8 Técnicas utilizadas en el Cultivo *in vitro* de *Dioscorea* spp.

Las técnicas utilizadas en el cultivo *in vitro* están fundamentadas en la propagación clonal que se refiere a la reproducción asexual o apomíctica de plantas en condiciones asépticas cuyas características son idénticas a la planta original (Krikorian, 1982) ofreciendo la reproducción de cultivares mejorados a través de cualquier sistema, además del desarrollo de una agricultura sostenible, que integra la sanidad y el mejoramiento de los cultivos, de los cuales se logra obtener gran número de plantas en un

tiempo relativamente corto. Entre los sistemas de propagación clonal del ñame, sobresalen la multiplicación de yemas, microtuberización, embriogénesis somática y propagación por segmentos nodales.

La propagación de segmentos nodales es uno de los métodos que permite un mayor número de plantas regeneradas. La técnica se basa en romper la latencia que tienen las yemas axilares y permitir la brotación para que posteriormente elonguen y se puedan subcultivar los nuevos segmentos originados. Consta de cinco fases: Obtención y mantenimiento de plantas madres, iniciación, multiplicación, enraizamiento y aclimatación. Rodríguez (2002), trabajando con *D. alata* en la Costa Atlántica Colombiana, reportó que 0.8 mgL^{-1} de ANA en la fase de enraizamiento, ofrece la mejor estructura radicular. En Jamaica, Mitchell, et. al. (1995) trabajando con *D. cayenensis* evaluó la iniciación de cultivos en diferentes épocas del año, el efecto del establecimiento de los explantes en diferentes medios, los efectos de la posición nodal en la planta madre (obteniendo un porcentaje de brotación del 90% para la posición nodal 9), el efecto del establecimiento de los explantes en diferentes épocas y el efecto de la concentración de nitrato de amonio y factores de crecimiento en las etapas de iniciación y multiplicación, reportando un coeficiente de multiplicación de 6.0.

Dentro del proceso de producción de plantas en sistemas *in vitro*, la fase de enraizamiento del material vegetal es un punto clave en la supervivencia y adaptación del material antes de su paso a condiciones de invernadero. Para el buen establecimiento y adaptación de las plantas al ambiente *ex vitro*, estas deben poseer una estructura radicular desarrollada, con cierta cantidad de pelos radicales, que se obtienen *in vitro* si se utiliza un balance adecuado de reguladores de crecimiento, un medio de cultivo adecuado e intensidad lumínica relativamente baja.

La aclimatación se convierte entonces en el paso definitivo entre el cultivo

in vitro y el establecimiento *in vivo*. Para aclimatar las vitro plantas a las nuevas condiciones ambientales, se deben controlar ciertos factores como luz, nutrientes y demás, ya que estas plantas, por adaptarse a condiciones de laboratorio, adquieren ciertas características condicionadas por el ambiente impuesto, tales como hojas blandas, finas y poco fotosintéticas, con células de empalizada pequeñas y en menor número, estomas poco funcionales que permanecen abiertos, conductos vasculares deficientes, que reducen el transporte de nutrientes, entre otros, de tal forma que si se omite la fase de aclimatación, las plantas presentarían trastornos que causarían su muerte.

En Colombia, la aclimatación y adaptación de los cultivos, son las mayores limitantes para la producción sostenible y eficiente convirtiéndose el uso de biofertilizantes en una alternativa económica y ecológica para la solución del problema. (Corredor, 2000).

La tasa máxima de asimilación fotosintética expresada por unidad de superficie foliar se alcanza al mismo tiempo que el máximo de área foliar. Sin embargo, el máximo de tasa de asimilación fotosintética expresada por hoja coincide con el momento en el que la hoja está completamente expandida y alcanza su superficie máxima. La determinación del área foliar generalmente se realiza con instrumentos sofisticados como planímetros ópticos o planímetros mecánicos, también por la relación área y peso, pero también es posible realizar aproximaciones muy exactas de su valor a través de medidas lineales de la hoja que son derivadas de tres medidas básicas como son el área basal, el área central y la longitud total desde el ápice hasta la base de la lamina foliar, las que se pueden utilizar en relaciones funcionales (ancho X largo). (Arsencio, 1985).

En condiciones naturales la mayoría de las plantas tropicales adaptadas a diversos nichos ecológicos se encuentran asociadas a microorganismos del suelo estableciendo relaciones benéficas (simbióticas). Dentro de

esos microorganismos y sus diferentes interacciones se destacan algunas relaciones positivas, como las asociaciones simbióticas micorrízicas presentes entre las raíces de las plantas y ciertos hongos del suelo que juegan un papel clave en la absorción de nutrientes, permitiendo aumentar el volumen de la raíz y por tanto una mayor exploración de la rizosfera, y en la protección de la planta frente a estrés cultural y ambiental.

Estudios recientes muestran los efectos benéficos de esta asociación en el mejoramiento de la aclimatación de plantas micropropagadas, reducción de la mortalidad de plantas que crecen en sustratos con bajos contenidos de fósforo y aumento de la aireación de suelos, reflejado en un incremento del peso seco de hojas y raíces. No existen reportes a escala mundial de utilización de micorrizas en especies de ñame (*Dioscorea ssp.*). Las micorrizas han solucionado problemas de micropropagación, aclimatación y nutrición de diferentes especies de importancia agrícola, reduciendo al mismo tiempo los costos de producción, ya que requieren una menor aplicación de insumos fertilizantes, riego y pesticidas, permitiendo establecer sistemas de producción más eficientes, precoces y productivos. (Corredor, 2000).

4.9 Propiedades físicas de un sustrato

Para obtener buenos resultados en la fase de invernadero de la mayoría de las especies vegetales, el sustrato debe poseer las siguientes características (Richards, et. al., 1964):

- Debe ser lo suficientemente poroso, de modo que se escurra el exceso de agua y permita una aireación adecuada.
- Debe estar libre de malezas, nemátodos y otros patógenos.
- No debe tener un nivel excesivo de salinidad.

- Debe poderse esterilizar con vapor o químicos sin que sufra efectos nocivos.
- Debe existir una adecuada provisión de nutrientes para todo el período, aunque suplementaciones con fertilizantes de lenta liberación son frecuentemente recomendados.

Un sustrato ideal para la aclimatación, debe estar provisto de suficiente porosidad para permitir una buena aireación y una alta capacidad de retención de agua, debe tener un buen drenaje y estar libre de patógenos (Hartmann, et. al., 1992).

Las raíces necesitan aireación. Tanto para poder tomar el oxígeno necesario para su respiración como para poder evacuar con rapidez el anhídrido carbónico resultante, al mismo tiempo, la planta necesita absorber agua a través de las raíces.

Está claro que en la fase de aclimatación *in vivo* se origina un escenario que puede presentar ciertas dificultades para las plántulas. Si hay un exceso de agua, ésta impedirá la entrada de aire, las raíces no podrán respirar y algunas de ellas morirán por este hecho. Si nos excedemos queriendo garantizar la aireación puede faltar agua. En ambos casos la planta sufre e incluso puede morir.

El difícil equilibrio entre aire y agua se alcanza mediante un sustrato que permita la entrada de aire poco después de haber regado adecuadamente.

4.10 Posibilidad de absorción de agua por parte de las raíces.

En un contenedor, el agua que llena los poros está a la presión atmosférica. Las raíces, para absorber el agua, deben ejercer una succión

o depresión generando una presión interna inferior a la atmosférica.

La depresión se ejerce a través de las membranas semipermeables de las raíces. Esta depresión tiene dos sumandos:

- a. Depresión generada en las hojas debida a la evapo-transpiración y transmitida hasta las raíces por medio del sistema vascular de la planta.
- b. Diferencia de las presiones osmóticas dentro y fuera de la raíz, dependen de la concentración en cada lado de la membrana, es decir, de la concentración de sales dentro y fuera de la raíz.

La depresión total generada en la raíz origina una fuerza que debe ser capaz de vencer la fuerza de cohesión molecular del agua que se encuentra llenando el poro con el que la raíz está en contacto.

La depresión más habitual suele estar comprendida entre 0 y 1 bar. (El valor cero corresponde a situaciones de substrato saturado). El valor máximo aproximado es del orden de 15 bar que muchas plantas ya no pueden superar.

Así, puede llegar un momento en el que, aunque exista algo de agua en el substrato, la depresión que haría falta para moverla es superior a la que puede ejercer la planta. En este momento pues, aún quedando algo de agua la planta no la puede utilizar, marchitándose.

Volviendo a los poros y sus tamaños, podemos crear la siguiente clasificación:

Macroporos: $>416\ \mu\text{m}$.

Son los que se vacían inmediatamente después de regar, facilitando el drenaje.

Mesoporos: de 416 a $10\ \mu\text{m}$.

Son los que contienen el agua normalmente disponible para la planta.

Microporos: de 10 a 0,2 μm

Contienen agua no disponible para la planta. Se considera este agua como de reserva, ya que puede pasar lentamente a los mesoporos al agotarse la de éstos.

Ultramicroporos: <0,2 μm .

Son los que contienen el agua no disponible para la planta.

Dicha clasificación nos permite determinar que en un contenedor, las plantas deben ser colocadas cuidadosamente, tratando que las raíces queden ubicadas ligeramente por encima de la zona de microporos (zona de mesoporos) para evitar el exceso de humedad en estas y favorecer la disponibilidad de agua para la planta después del riego, y así garantizar un manejo óptimo del agua y minimizar los riesgos de daño de las raíces, y por ende de las plantas, causado por el exceso de agua.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 LOCALIZACIÓN

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja, en la ciudad de Sincelejo – Sucre - Colombia, a los $9^{\circ} 18'$ de latitud Norte y $75^{\circ} 23'$ de longitud al oeste del meridiano de Greenwich, a una altitud de 212 metros sobre el nivel del mar (Instituto Geográfico Agustín Codazzi, 1998).

5.2 FASE DE ENRAIZAMIENTO

5.2.1 Unidad experimental. Se tomó un explante por frasco con medio de cultivo.

5.2.2 Tratamientos. En la fase de enraizamiento, se utilizó un diseño experimental de 5 bloques completos al azar y como tratamientos, cada una de las concentraciones de los 4 diferentes reguladores de crecimiento utilizados (Tabla 3)

5.2.3 Variables Dependientes. Se tuvieron en cuenta las variables: numero de raíces primarias, numero de raíces secundarias, longitud promedio de raíces primarias, numero de hojas nuevas y numero de nudos nuevos. A cada una de las variables incluidas en este ensayo, se le realizó prueba de Homogeneidad de varianza (f máxima de Hartley) y de Normalidad (Shapiro-Wilk) para garantizar el cumplimiento de los supuestos del análisis de varianza y la validez de los resultados.

Tabla 3. Tratamientos aplicados en el ensayo de Enraizamiento

REGULADOR DE CRECIMIENTO	TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN mgL ⁻¹
AIA	1	1,0
	2	2,0
	3	4,0
ANA	4	0,4
	5	0,8
	6	1,2
AIB	7	0.1
	8	0.5
	9	1.0
	10	2.0
2.4-D	11	0.1
	12	0.2
	13	0.4
	14	0.8
CONTROL	15	0.0

5.3 FASE DE ACLIMATACIÓN

5.3.1 Unidad experimental. Como unidad experimental en esta fase se tomó una planta por cada vaso con sustrato.

5.3.2 Tratamientos. En la fase de aclimatación se usó un diseño experimental de 12 bloques incompletos al azar y como tratamientos cada uno de los ambientes que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos aplicados en el ensayo de aclimatación.

TRATAMIENTO	AMBIENTE
1	Con micorriza Tapado
2	Con micorriza Destapado
3	Sin micorriza Tapado
4	Sin micorriza Destapado
5	Control Tapado
6	Control Destapado

5.3.3 Variables Dependientes. En ésta fase se tuvieron en cuenta las variables: tamaño de la planta (longitud del tallo), número de hojas nuevas, número de hojas muertas y área foliar promedio. A cada una de estas variables, se le realizó prueba de Homogeneidad de varianza (f máxima de Hartley) y de Normalidad (Shapiro-Wilk) para garantizar el cumplimiento de los supuestos del análisis de varianza y la validez de los resultados.

De igual forma se hizo un análisis de varianza combinado entre los ensayos con raíces Tipo A y raíces Tipo B (raíces obtenidas *in vitro* en medio de enraizamiento al cabo de 10 y 6 semanas respectivamente). En el ensayo con raíces Tipo A se hicieron 7 repeticiones por tratamiento y en el ensayo con raíces Tipo B se hicieron 5 repeticiones por tratamiento.

Paralelamente se efectuó un análisis de promedios, combinando los dos ensayos (raíces Tipo A y Tipo B) y discriminando los tratamientos tapados de los destapados así como los que contenían micorriza de los que no contenían, con el fin de establecer cual de estos ambientes ofrece mejores resultados en términos de valores promedio para cada una de las variables en estudio.

Todos los datos fueron analizados con el programa estadístico SAS®.

6. METODOLOGÍA

6.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRES.

Se obtuvieron plantas a partir segmentos de tubérculos de *Dioscorea cayenensis* Cv “Ñame Amarillo”, provenientes de Jamaica e importados al país por C.I. LALVI & CIA. LTDA., para su propagación clonal y posterior aclimatación a condiciones *in vivo*.

6.1.1 Preparación del sustrato. Se utilizó un sustrato compuesto de arena, tierra negra y material orgánico (bovinaza) en proporción 1:1:1. El sustrato se empacó en bolsas de polietileno tipo silo y se esterilizó químicamente con una solución de formol 5 ml/L, Benoagro® 2 g/L, y NaOCl 5 ml/L por espacio de 48 horas.

6.1.2 Preparación de la semilla. El tubérculo se cortó en piezas de aproximadamente 60 gramos y se desinfectó sumergiéndolas en agua a 50 °C por 5 minutos para eliminar los posibles nematodos que pueda contener el tubérculo y luego en Benoagro® 2 g/L por 10 minutos como tratamiento anti-fúngico y se dejó secar sobre papel absorbente por 24 horas (Figura 1).

Figura 1. Segmentos de tubérculos de *Dioscorea cayenensis*, desinfectados y listos para ser sembrados.



6.1.3 Siembra de la semilla. La semilla previamente desinfectada se sembró en sustrato estéril empacado en bolsas de polietileno de 1 Kg y se llevó a casa malla en donde se le aplicó riego manual 3 veces por semana entre las 5 y 6 p.m., con un seguimiento constante de su desarrollo.

6.2 SELECCIÓN DE LA PLANTA MADRE.

Se seleccionaron plantas con un crecimiento vigoroso y una estructura aérea ideal, para el corte de segmentos nodales (Figura 2), e iniciar la propagación clonal de plantas y su posterior aclimatación a condiciones *in vivo*.

Figura 2. Plantas de *D. cayenensis* con crecimiento vigoroso en casa malla.



6.3 FASE DE DESINFECCIÓN

6.3.1 Preparación del explante. Los segmentos nodales cortados (Figura 3) se lavaron con una solución de Tween 20 al 2% v/v y se enjuagaron con abundante agua estéril hasta eliminar todo el detergente. Dentro de la

cabina de flujo laminar se sumergieron los explantes en solución de etanol al 70% v/v por 60 segundos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril. Luego, se sumergieron en una solución de peróxido de hidrógeno al 2% v/v por 60 segundos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril.

Finalmente se lavaron con NaOCl al 2% durante 10 minutos, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril, según lo propuesto por Pérez y Brun en el 2003.

Figura 3. Segmentos nodales de *D. cayenensis* antes del proceso de desinfección en cabina de flujo laminar.



6.4 FASE DE INICIACIÓN

Se utilizó el medio MS sólido suplementado con 100 mgL^{-1} de mioinositol, 0.1 mgL^{-1} de tiamina-HCl, 30 gL^{-1} de sacarosa y 7 gL^{-1} de agar, y se adicionó 0.9 mgL^{-1} de BA, (pH 5.7 - 5.8) según lo propuesto por Pérez y Brun en el 2003. Los segmentos nodales se incubaron en cuarto de crecimiento con una temperatura promedio de 27°C fotoperíodo de 12 horas (Figura 4).

Figura 4. Cultivo de segmentos nodales de *Dioscorea cayenensis* en medio de iniciación.



6.5 FASE DE MULTIPLICACIÓN

Los explantes se sembraron en medio MS suplementado con 100 mgL⁻¹ de mioinositol, 0.1 mgL⁻¹ de tiamina-HCl, 30 gL⁻¹ de sacarosa, 800 mgL⁻¹ de NH₄NO₃, 0.5 mgL⁻¹ de piridoxina-HCl, 0.5 mgL⁻¹ de ácido nicotínico, 2 mgL⁻¹ de glicina (Mitchell, et. al., 1995), 7 gL⁻¹ de agar, 1 gL⁻¹ de carbón activado, 20 mgL⁻¹ de L-cisteína, 20 mgL⁻¹ de ácido ascórbico y 1,2 mgL⁻¹ de BA, (pH 5.7-5.8) siguiendo la metodología de Pérez y Brun en el 2003 (Figura 5). Los explantes se incubaron en cuarto de crecimiento con una temperatura promedio de 27°C fotoperíodo de 12 horas.

Figura 5. Paso de explantes a medio de multiplicación.



6.6 FASE DE ENRAIZAMIENTO.

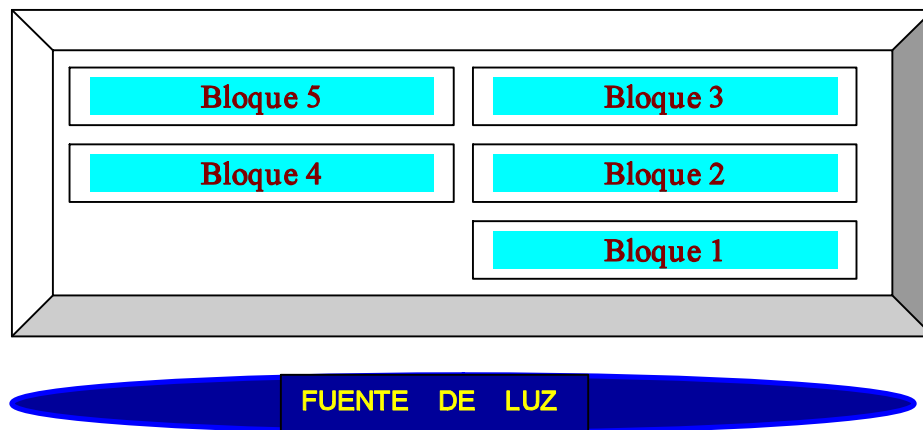
Las plántulas provenientes de un tercer subcultivo de multiplicación se sembraron en medio MS suplementado con 100 mgL^{-1} de mioinositol, 0.1 mgL^{-1} de tiamina-HCl, 30 gL^{-1} de sacarosa, 7 gL^{-1} de agar, 1 gL^{-1} de carbón activado (pH 5.7 - 5.8) y se le adicionó el regulador de crecimiento en cada uno de los tratamientos (Tabla 3)

Todo el material se incubó en cuarto de crecimiento a 27°C sobre estantería de hierro, en donde se distribuyó en 5 bloques completos al azar (Figura 7) durante 10 semanas con un fotoperíodo de 12 horas, y una intensidad lumínica promedio de 10.6, 9.6, 3.8, 2.6 y $4.3 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para los bloques del 1 al 5 respectivamente, suministrada por dos lámparas fluorescentes Sylvania® Daylight de 75 W (Figura 6).

Figura 6. Disposición de los bloques en el ensayo de enraizamiento.



Figura 7. Esquema de la disposición en bloques del ensayo de enraizamiento.



6.7 FASE DE ACLIMATACIÓN *IN VIVO*.

En esta etapa, las plántulas de *D. cayenensis* provenientes del cultivo *in Vitro*, se sembraron en un sustrato compuesto por arena, materia orgánica (bovinaza) y tierra negra, en proporciones 1:1:1, contenido en vasos de icopor con orificios en el fondo. Las plántulas fueron colocadas en dicho sustrato, en la zona de mesoporos, para garantizar el aporte de agua disponible en el sustrato.

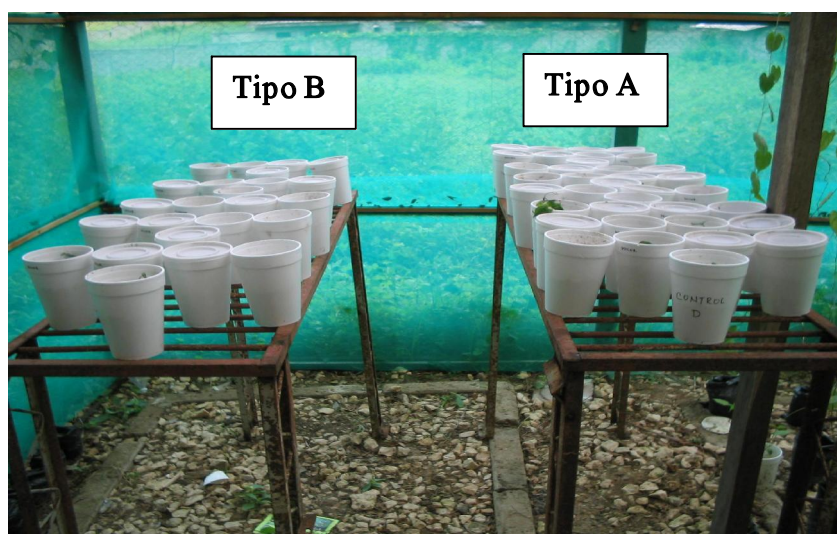
Estos fueron llevados a casa malla en donde se mantuvieron bajo techo de sarán (polisombra) de un 50% a una distancia de 1 m, con promedios de temperatura y humedad relativa de 27.82°C y 52.6% respectivamente durante 6 semanas. A mediados de la primera semana de iniciado el experimento, se realizó fumigación manual asperjada con solución de Benoagro® 2 gL⁻¹. Todo el experimento se llevó a cabo sobre mesas de hierro de 1 m de altura, en donde se distribuyeron los tratamientos en bloques incompletos al azar (Figura 8), para evaluar el efecto de dos ambientes distintos, tapado: con promedios de temperatura y humedad relativa de 31°C, y 85% respectivamente, y destapado: con temperatura y humedad relativa promedio iguales al ambiente de la casa de malla, y el

efecto de la presencia ó ausencia de inóculos de micorriza de una marca comercial (MYCORAL®) en el endurecimiento de *in vitro* plantas de *Dioscorea cayenensis* con dos tipos de estructura radicular, identificadas como raíces Tipo A (raíces obtenidas *in vitro* al cabo de 10 semanas en medio de enraizamiento) y raíces Tipo B (raíces obtenidas *in vitro* al cabo de 6 semanas en medio de enraizamiento). (Ver Figura 12).

La determinación del área foliar se hizo de acuerdo con la metodología propuesta por Arsencio en el 1985.

Al cabo de 4 semanas, al ambiente tapado, se le hicieron 10-15 agujeros de 2 mm de diámetro en las tapas con el fin de disminuir gradualmente la humedad relativa y a la siguiente semana se destaparon completamente. Además, durante las primeras 4 semanas se les aplicó riego manual asperjado con agua potable en un volumen aproximado de 70 mL por planta cada 2 días.

Figura 8. Disposición de los bloques en casa malla para el ensayo de aclimatación.



7. RESULTADOS

7.1 FASE DE ENRAIZAMIENTO

A cada una de las variables incluidas en este ensayo, se le realizó prueba de homogeneidad de varianza (f máxima de Hartley) y de Normalidad (Shapiro-Wilk) para garantizar el cumplimiento de los supuestos del análisis de varianza y la validez de los resultados, y se encontró que todas las variables cumplieron con estos supuestos (Tabla 5).

Tabla 5. Cuadrados medios del análisis de varianza para el ensayo de enraizamiento.

Fuente de variación	Grados de libertad	N° raíces primarias	N° raíces secundarias	N° total de raíces	LONGITUD PROMEDIO RAICES PRIMARIAS	N° hojas nuevas	N° nudos nuevos
Bloque	4	0,008*	0,68ns	0,54ns	0,100ns	0,130*	0,130*
Tratamiento	14	0,037ns	0,31ns	0,29ns	0,063ns	0,046ns	0,048ns
Error	53	0,030	0,36	0,3	0,065	0,044	0,047
Promedio real		3,055	26,805	30,18	8,227	3,43	3,333
Coeficiente de variación (%)		13,16	29,28	25,44	15,15	15,44	16,24
Homogeneidad		23,63ns	19,73ns	20,42ns	106,78ns	15,79ns	86,83ns
Normalidad		0,98ns	0,98ns	0,98ns	0,98ns	0,99ns	0,98ns

* Diferencia estadística significativa a nivel del 5%

** Diferencia estadística significativa a nivel del 1%

*** Diferencia estadística significativa a nivel del 0.1%

ns Diferencia estadística no significativa

La tabla 6 muestra los promedios por tratamiento para el ensayo de enraizamiento, en donde se observa la no diferencia estadística entre ellos (Grafico 1), sin embargo, los valores mas altos en promedio para cada una de las variables se resumen en la tabla7.

Tabla 6. Promedios por tratamientos para el ensayo de enraizamiento.

TRAT.	Nº RAICES 1 ^{as}	Nº RAICES 2 ^{as}	Nº TOTAL RAICES	LONGITUD PROMEDIO RAICES 1 ^{as} (cm)	Nº HOJAS NUEVAS	Nº NUDOS NUEVOS
1	3.75 a	41.00 a	44.75 a	7.93 a	3.75 a	3.75 a
2	2.00 a	20.40 a	22.40 a	7.94 a	4.00 a	4.00 a
3	2.00 a	22.00 a	24.00 a	5.78 a	2.00 a	1.80 a
4	4.20 a	38.00 a	42.20 a	6.50 a	4.40 a	3.80 a
5	5.25 a	25.50 a	30.75 a	6.45 a	4.25 a	3.50 a
6	3.20 a	36.00 a	39.20 a	8.88 a	3.00 a	3.20 a
7	2.80 a	22.80 a	30.20 a	10.04 a	3.60 a	3.20 a
8	3.25 a	21.75 a	25.00 a	7.18 a	3.00 a	2.75 a
9	3.60 a	45.60 a	49.20 a	9.32 a	3.60 a	3.60 a
10	2.40 a	19.40 a	21.80 a	12.04 a	4.20 a	4.60 a
11	2.80 a	20.00 a	22.80 a	8.90 a	3.40 a	3.40 a
12	3.40 a	27.80 a	31.20 a	7.90 a	2.80 a	2.60 a
13	2.40 a	11.60 a	14.00 a	5.26 a	4.80 a	5.00 a
14	2.60 a	35.20 a	37.80 a	10.98 a	1.80 a	2.00 a
15	2.80 a	16.60 a	19.40 a	7.70 a	3.00 a	2.80 a
Promedio general	3.06 a	26.81 a	30.18 a	8.23 a	3.43 a	3.33 a

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales,

Gráfico 1. Promedios por tratamientos para el ensayo de enraizamiento.

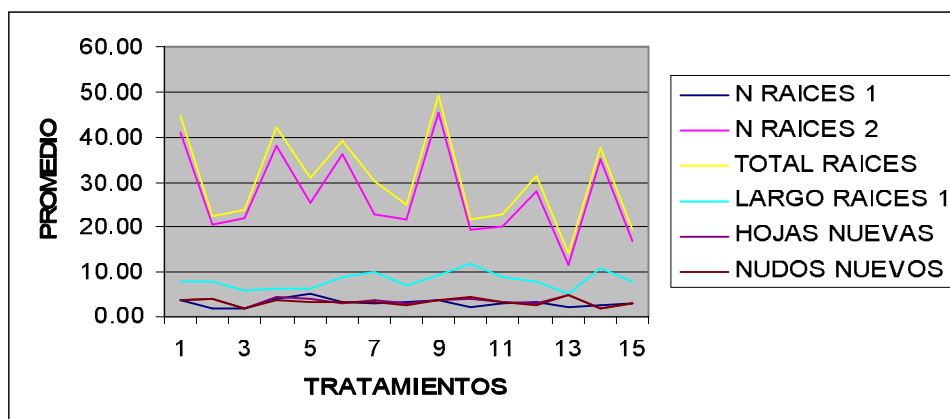


Tabla 7. Promedios más altos para cada una de las variables en el ensayo de enraizamiento.

VARIABLE	PROMEDIO	TRATAMIENTO
Nº RAICES PRIMARIAS	5.25	5
Nº RAICES SECUNDARIAS	45.6	9
Nº TOTAL RAICES	49.2	9
LONGITUD PROMEDIO RAICES PRIMARIAS (cm)	12.0	10
Nº HOJAS NUEVAS	4.80	13
Nº NUDOS NUEVOS	5.00	13

7.1.1 Número de raíces primarias, número de hojas nuevas y número de nudos nuevos. La tabla 5 muestra el análisis de varianza para estas variables y en dicha tabla se observa que existe una diferencia estadística significativa a nivel del 5% entre los bloques, pero no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos.

Figura 9. Plantas de *D. cayenensis* Bloque 5 en etapa de enraizamiento, en donde se observa el desarrollo de raíces primarias (A), numero de hojas nuevas (B) y numero de nudos nuevos (C).

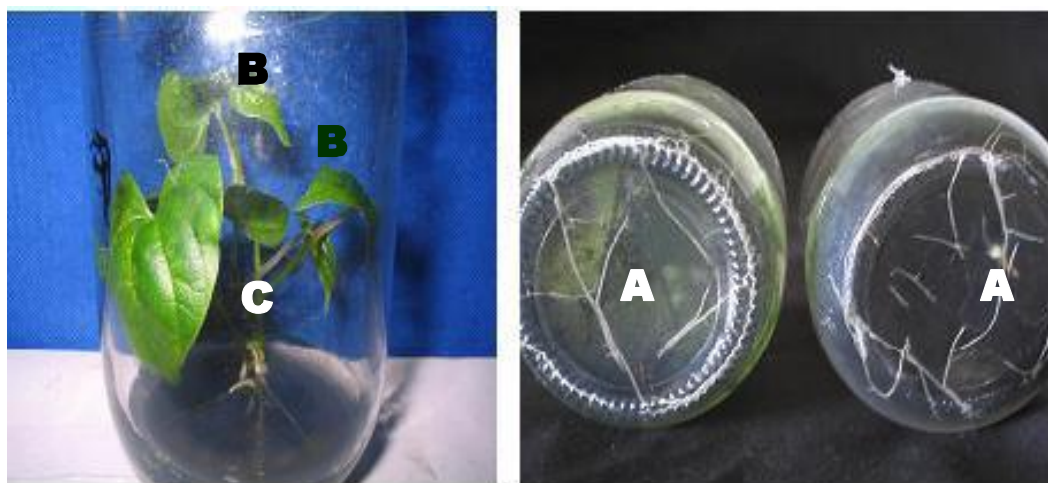


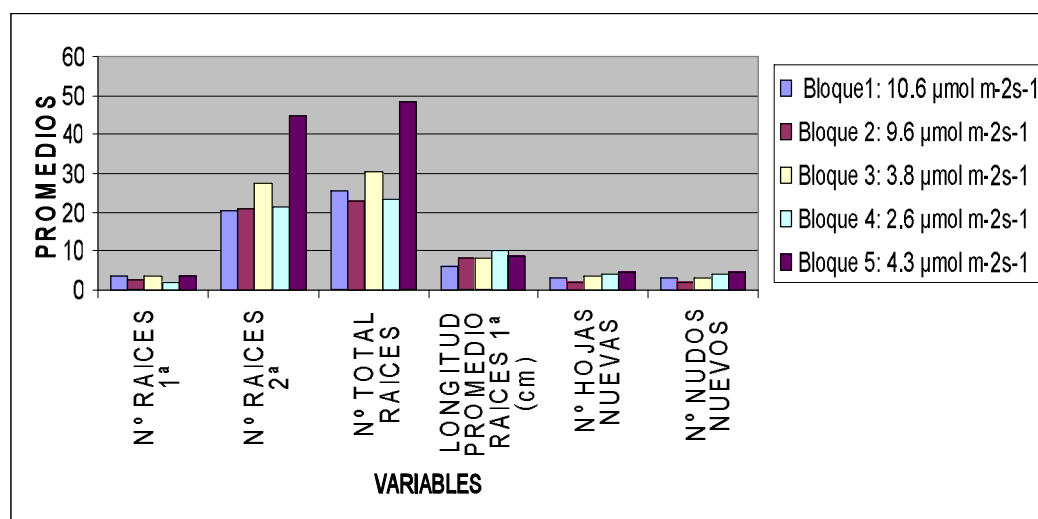
Tabla 8. Prueba de separación de medias de Tukey al 5% para los bloques en el ensayo de enraizamiento.

BLOQUE	Nº RAICES PRIMARIAS	Nº RAICES SECUNDARIAS	Nº TOTAL RAICES	LONGITUD PROMEDIO RAICES PRIMARIAS (cm)	Nº HOJAS NUEVAS	Nº NUDOS NUEVOS
1	3.71 a	20.29 b	25.64 ab	5.96 b	2.93 bc	2.93 ab
2	2.40 ab	20.73 b	23.13 b	8.09 ab	2.13 c	2.07 b
3	3.40 a	27.27 ab	30.67 ab	8.23 ab	3.67 ab	3.27 ab
4	2.00 b	21.50 b	23.50 b	10.35 a	3.93 abc	4.00 a
5	3.79 a	44.64 a	48.43 a	8.52 ab	4.57 a	4.50 a

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales.

La prueba de separación de medias de Tukey al 5% (tabla 8), muestra que los mejores resultados para estas variables (Número de raíces primarias, número de hojas nuevas y número de nudos nuevos) los obtuvo el bloque 5 con valores de 3.79, 4.57 y 4.5 respectivamente (Figura 9), seguido por los bloques 3 y 4 (ver Grafico 2).

Grafico 2. Promedios por bloques para el ensayo de enraizamiento.



En las figuras 10 y 11 se muestran plantas de los bloques 5 y 3, los cuales fueron quienes presentaron valores promedio más sobresalientes para las variables críticas en la etapa de enraizamiento

Figura 10. Desarrollo radicular en *vitro* plantas de *D. cayenensis* del Bloque 5 del ensayo de enraizamiento.



Figura 11. Desarrollo radicular en *vitro* plantas de *D. cayenensis* del Bloque 3 del ensayo de enraizamiento.



7.1.2 Número de raíces secundarias, número total de raíces y longitud promedio de raíces primarias. De acuerdo con los datos mostrados en la tabla 5, para estas variables no se encontró diferencia estadística significativa entre los tratamientos ni entre los bloques, pero mediante una prueba de separación de medias de Tukey al 5% (tabla 8) podemos decir que los mejores promedios para número de raíces secundarias y número total de raíces se dieron en el bloque 5 con valores de 44.66 y 48.43 respectivamente, seguido del bloque 3 con valores de 27.27 y 30.67 respectivamente (Figura 10 y 11), mientras que para la longitud promedio de raíces primarias el mayor promedio se obtuvo en el bloque 4 con un promedio de 10.35, seguido de los bloques 5 y 3 con promedios de 8.52 y 8.23 respectivamente (Grafico 2).

7.2 FASE DE ACLIMATACIÓN

En esta fase se realizaron dos ensayos por separado, uno con raíces Tipo A y otro con raíces Tipo B (Figura 12), para los cuales se hizo un análisis de varianza combinado con el fin de poder determinar si las nuevas plantas presentaban diferencias de acuerdo al tipo de raíz utilizada en el proceso de aclimatación, dicho análisis no mostró diferencia estadística significativa entre los dos tipos de raíces (tabla 10) en ninguna de las variables evaluadas.

En esta fase se obtuvo un porcentaje de supervivencia del 95 % de las plantas, independientemente de los tratamientos, como se muestra en el grafico 3 y en la tabla 9, pero cabe anotar que en el contraste realizado entre los tratamientos tapados y destapados se observa que la diferencia en porcentaje de supervivencia que se aprecia entre los tratamientos, favorece al micro ambiente tapado.

Tabla 9. Porcentaje de supervivencia en el ensayo de aclimatación.

TRATAMIENTOS	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Tapados	Destapados
% DE SUPERVIVENCIA	100	92.4	92.4	92.4	100	100	96.6	93.33

Grafico 3. Porcentaje de supervivencia en el ensayo de aclimatación.

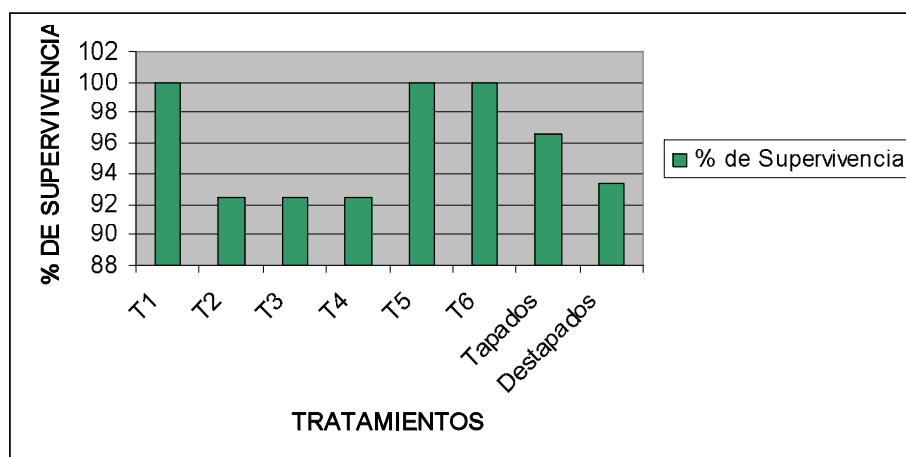


Figura 12. Diferencia entre las raíces identificadas como Tipo A y Tipo B.



TABLA 10. Análisis de varianza combinado para los ensayos con raíces Tipo A y B en aclimatación de *D. Cayenensis*.

FUENTE DE VARIACIÓN	D.F	TAMAÑO de la PLANTA	AREA FOLIAR PROMEDIO	Nº HOJAS NUEVAS	Nº HOJAS MUERTAS
ENSAYO	1	0.496 ns	0.153 ns	0.011 ns	0.006 ns
BLOQUE (Ensayo)	11	0.222	0.054	0.009	0.029
TRATAMIENTO	5	0.537 **	0.023 ns	0.190 ***	0.080 ns
TAPADO Vs DESTAPADO	1	1.506 **	0.015 ns	0.398 ***	0.229 *
CON M. Vs SIN M.	1	0.125 ns	0.055 ns	0.020 ns	0.002 ns
ENSAYO*TRATAMIENTO	5	0.046 ns	0.015 ns	0.041 ns	0.029 ns
ERROR	34	0.129	0.058	0.020	0.039

* Diferencia estadística significativa a nivel del 5%

** Diferencia estadística significativa a nivel del 1%

*** Diferencia estadística significativa a nivel del 0.1%

ns Diferencia estadística no significativa

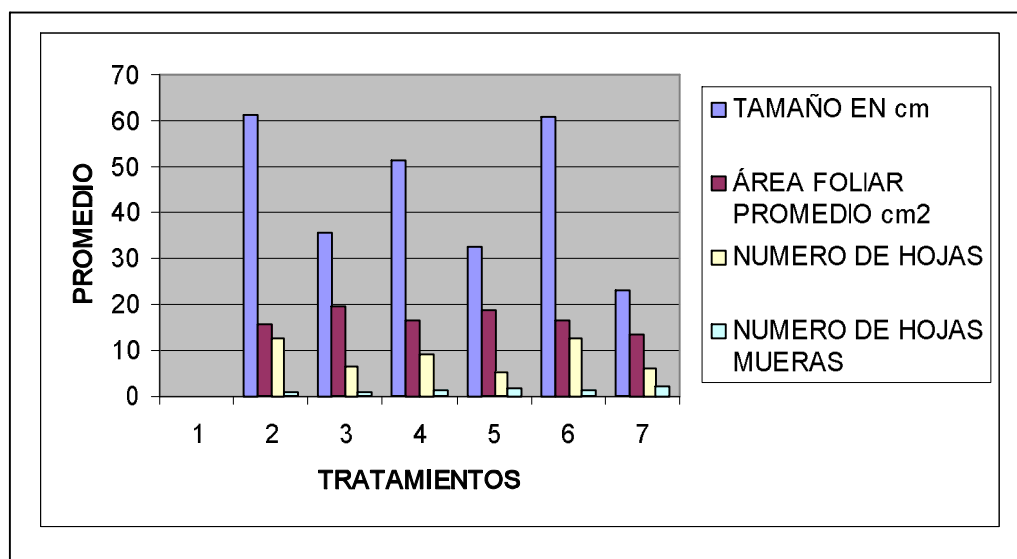
En la Tabla 11 se ilustran los valores promedio por tratamiento para las diferentes variables evaluadas en el ensayo de aclimatación combinado (Grafico 4).

Tabla 11. Promedios por tratamientos del análisis combinado de raíces tipo A y B, para el ensayo de aclimatación de *D. Cayenensis*.

TRATAMIENTO	TAMAÑO DE LA PLANTA (cm)	ÁREA FOLIAR PROMEDIO cm ²	NUMERO DE HOJAS NUEVAS	NUMERO DE HOJAS MUERTAS
1	61.26 a	15.72 a	12.45 a	0.75 b
2	35.56 ab	19.63 a	6.69 a	0.95 ab
3	51.25 ab	16.35 a	9.00 a	1.19 ab
4	32.61 c	18.77 a	5.34 b	1.67 ab
5	60.75 a	16.62 a	12.75 a	1.50 ab
6	23.00 bc	13.39 a	6.00 b	2.37 a

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales.

Grafico 4. Promedios por tratamiento para el análisis combinado de raíces tipo A y B para el ensayo de aclimatación de *D. Cayenensis*.



Paralelamente se efectuó un análisis de promedios, combinando los dos ensayos (raíces Tipo A y Tipo B) y discriminando los tratamientos tapados de los destapados con el fin de establecer cual de estos ambientes ofrece mejores resultados en términos de valores promedio para cada una de las variables en estudio. (Tabla 12).

Tabla 12. Promedios de las variables evaluadas para los tratamientos Tapados y Destapados en el análisis combinado de los ensayos de aclimatación con raíces Tipo A y Tipo B.

GRUPO	TAMAÑO de la PLANTA(cm)	AREA FOLIAR PROMEDIO (cm ²)	Nº HOJAS NUEVAS	Nº HOJAS MUERTAS
Tapado	60.38 a	16.62 a	11.14 a	1.13 b
Destapado	35.82 b	20.05 a	6.36 b	2.07 a

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales.

De acuerdo a los valores mostrados en la tabla 12 podemos afirmar que el ambiente tapado ofrece mayor promedio para las variables tamaño de

la planta y número de hojas nuevas, a la vez que presenta un menor número de hojas muertas.

7.2.1 Tamaño de la planta. En la tabla 10, la variable tamaño de la planta no presentó diferencia estadística significativa entre los dos tipos de raíces (Tipo A y Tipo B), mientras que entre los tratamientos se obtuvo diferencia estadística altamente significativa a nivel del 1%. Adicionalmente, la prueba de contrastes ortogonales mostró que existe una diferencia altamente significativa entre los tratamientos tapados y destapados, mientras que no existe diferencia estadística significativa en el contraste para los tratamientos con y sin Micorriza.

La Tabla 11, muestra que los tratamientos donde se obtuvieron los mayores tamaños de planta fueron T1 (con Micorriza Tapado) y T5 (control Tapado) con 61.26 y 60.75 cm respectivamente. La tabla 12, muestra que en los tratamientos tapados se obtuvo un tamaño de planta promedio de 60.38 cm y los destapados de 35.82 cm.

7.2.2 Área foliar promedio. En la tabla 10, se puede observar que para esta variable no existe diferencia estadística significativa entre los ensayos ni entre los tratamientos pero podemos anotar que el mayor valor promedio para esta variable se obtuvo para T2 (con Micorriza Destapado) con un promedio de 19.63 cm² (Tabla 11).

7.2.3 Número de hojas nuevas. Según los datos mostrados en la Tabla 10 para esta variable, podemos decir que no existe diferencia estadística significativa entre los ensayos, pero esta si se aprecia a nivel del 0.1 % entre los tratamientos al comparar los grupos tapado vs destapado y que no se encontró diferencia estadística significativa al comparar los que contenían micorriza con los que no la contenían. En la Tabla 11 se observa que los tratamientos con mayores promedios para esta variable fueron T5 (control Tapado) y T1 (con Micorriza Tapado) con valores de

12.75 y 12.45 respectivamente. En la Tabla 12 podemos observar que en el contraste entre los tratamientos tapado vs destapado, el mayor valor promedio se obtuvo en el tratamiento tapado, con un valor promedio de 11.14.

7.2.4 Número de hojas muertas. En la Tabla 10 se ilustran los resultados para ésta variable, indicando que no hay diferencia estadística significativa entre los ensayos. Lo contrario se observa entre los tratamientos en donde al comparar los tapados Vs destapado, se encontró diferencia estadística significativa a nivel del 5% y que al comparar los que contenían micorriza con los que no contenían, no se encontró diferencia estadística significativa alguna. De igual forma, se observa en la tabla 11 que el tratamiento 1 (con Micorriza Tapado) es quien ofrece el menor numero de hojas muertas con un valor promedio de 0.75, en contraste con el tratamiento 6 (control Destapado), el cual presenta un mayor promedio de mortalidad foliar con un valor de 2.37. En el contraste tapado vs destapado (tabla 12) se observa que el menor valor promedio de mortalidad foliar se obtuvo en el tratamiento tapado, con un valor promedio de 1.13 hojas muertas por planta.

Por otro lado, a sabiendas que la estructura radicular Tipo A o B no afecta la aclimatación de *Dioscorea cayenensis*, se realizó un análisis de varianza a cada ensayo por separado para evaluar el comportamiento de las variables dentro de cada uno de ellos así:

7.3 ENSAYO DE ACLIMATACIÓN CON RAÍCES TIPO A.

En este ensayo, a cada una de las variables incluidas se les realizó prueba de Homogeneidad de varianza y de Normalidad, para garantizar el cumplimiento de los supuestos del análisis de varianza y la validez de los resultados. Según los datos mostrados en la tabla 13 podemos decir que todas las variables cumplen con estos supuestos.

En la figura 13 se muestran las plantas correspondientes al ensayo de aclimatación para las raíces Tipo A.

Figura 13. Ensayo de aclimatación con raíces Tipo A, a la 6^a semana.



Tabla 13. Cuadrados medios del análisis de varianza para el ensayo de aclimatación con raíces Tipo A.

Fuente de variación	Grados de libertad	Tamaño de la Planta	Área foliar promedio	N° de hojas nuevas	N° de hojas muertas
Bloque	6	0,12ns	0,07ns	0,003ns	0,034ns
Tratamiento	5	0,53**	0,02ns	0,150***	0,100*
Tapado Vs Destapado	1	1.553 **	0.002 ns	0.539 ***	0.341 **
Sin M. Vs Con M.	1	0.100 ns	0.015 ns	0.027 ns	0.00004 ns
Error	22	0,12	0,05	0,39	0,033
Promedio real		53,9	19,6	9	1,7
Coefficiente de variación (%)		12,9	10,7	7,88	15,81
Homogeneidad		11,5ns	4,8ns	9,73ns	36,54ns
Normalidad		0,97ns	0,95ns	0,96ns	0,94ns

* Diferencia estadística significativa a nivel del 5%

** Diferencia estadística significativa a nivel del 1%

*** Diferencia estadística significativa a nivel del 0.1%

ns Diferencia estadística no significativa

Adicionalmente se realizó una prueba de separación de medias (DMS) al 5% para las variables que presentaron diferencia estadística significativa

(Tabla 14) en la cual se puede observar que para la variable tamaño de la planta , el tratamiento que ofrece un mayor promedio fue T1 (con micorriza tapado, Figura 14), seguido de T5 (control tapado) con promedios de 74.1 cm y 69 cm respectivamente (Grafico 5).

Figura 14. Tratamientos T1 y T5 a la 6ª semana de aclimatación.

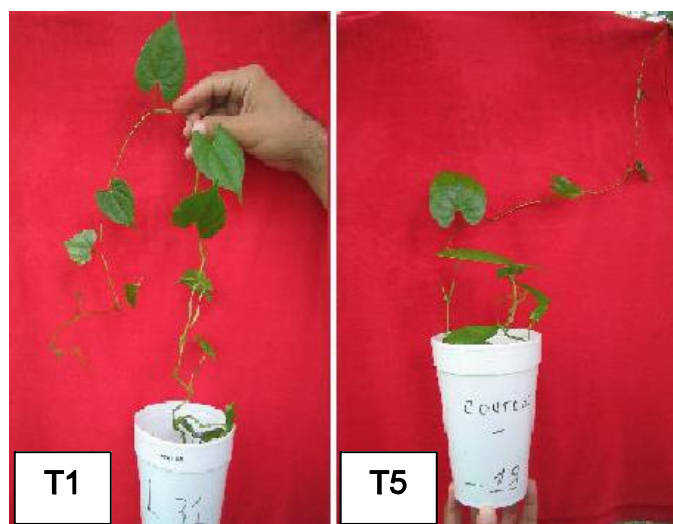


Tabla 14. Prueba (DMS) de separación de medias de Tukey al 5% para el ensayo de aclimatación con raíces Tipo A.

Tratamiento	Tamaño (cm)	Área foliar promedio (cm ²)	N° de hojas nuevas	N° de hojas muertas
Con tapado (T1)	74,1 a	17,3 a	11,5 a	0,6 bc
Sin tapado (T2)	64,3 ab	18,9 a	11,0 ab	1,4 abc
Con destapado (T3)	43,1 abc	22,1 a	6,6 c	2,8 a
Sin destapado (T4)	33,4 bc	21,4 a	5,3 c	2,1 ab
Control tapado (T5)	69,0 a	18,9 a	15,5 a	0,5 c
Control destapado (T6)	30,5 c	16,0 a	7,5 bc	2,0 ab

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales

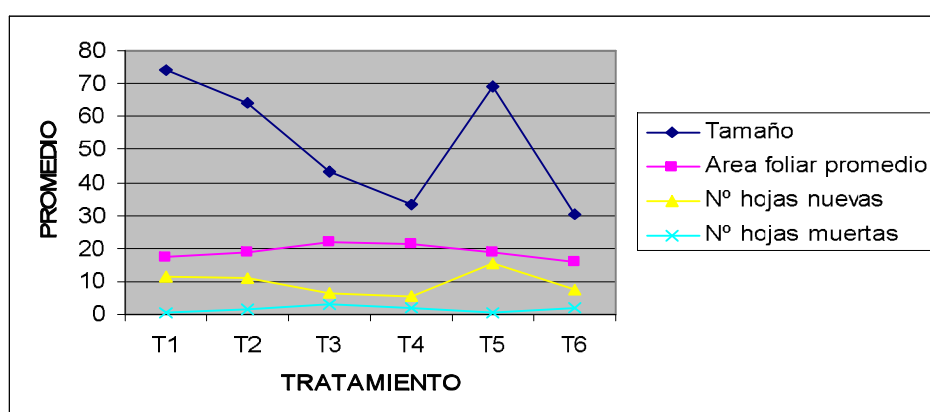
Para la variable área foliar promedio no se encontró diferencia estadística significativa mas sin embargo cabe resaltar que el tratamiento que muestra mayor área foliar promedio es T3 (sin Micorriza Tapado), con un

valor de 22.1 cm².

En la variable número de hojas nuevas, se encontró diferencia estadística significativa entre los tratamientos a nivel del 0.1% y para la variable número de hojas muertas del 5% (Tabla 13).

El tratamiento con mayor promedio de hojas nuevas fue T5 (control tapado), seguido de T1 (con micorriza tapado) con promedios de 15.5 y 11.5 respectivamente. De igual forma, para la variable número de hojas muertas podemos ver que el tratamiento que menor promedio ofrece es el T5 (control tapado), seguido de T1 (con micorriza tapado), con valores de 0.5 y 0.6 respectivamente (Tabla 14, Grafico 5).

Grafico 5. Promedios por tratamiento para el ensayo de aclimatación con raíces tipo A.



Teniendo en cuenta que en el análisis de varianza combinado para los ensayos de raíces Tipo A y raíces Tipo B (Tabla 10) se observó diferencia estadística significativa entre los grupos tapado Vs destapado, en las variables tamaño de la planta, N° de hojas nuevas y N° de hojas muertas, se realizó un análisis de promedios entre dichos tratamientos para raíces Tipo A y raíces Tipo B por separado como se muestra en las Tablas 15 y 19 respectivamente.

Tabla 15. Promedio de los tratamientos Tapados y Destapados en el ensayo de aclimatación con raíces Tipo A.

GRUPO	TAMAÑO de la PLANTA (cm)	AREA FOLIAR PROMEDIO (cm ²)	Nº HOJAS NUEVAS	Nº HOJAS MUERTAS
Tapado	69.17 a	18.19 a	11.72 a	0.94 b
Destapado	37.65 b	21.08 a	6.18 b	2.41 a

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales

Según los datos mostrados en la Tabla 15 podemos decir que para las variables tamaño de la planta y número de hojas nuevas, el ambiente que mayor promedio presentó fue el tapado, con valores de 69.17 y 11.72 respectivamente, al igual que presenta una menor mortalidad foliar con un valor de 0.94 en contraste con su contraparte destapado que presentó una mortalidad foliar promedio de 2.41.

7.4 ENSAYO DE ACLIMATACIÓN CON RAÍCES TIPO B.

En la figura 15 se muestra la disposición del ensayo de aclimatación en casa malla a la 6ª semana de iniciado el experimento.

Figura 15. . Ensayo de aclimatación con raíces Tipo B, a la 6ª semana.



El análisis de varianza para este ensayo (Tabla 16) muestra que no existe diferencia estadística significativa entre bloques ni entre tratamientos para las variables tamaño de la planta, área foliar y número de hojas muertas, mientras que para la variable número de hojas nuevas se obtuvo diferencia estadística significativa a nivel del 5% entre los tratamientos. De igual forma, se observa diferencia estadística altamente significativa a nivel del 0.1% para la variable número de hojas nuevas, en el contraste entre tapados y destapados. El contraste ortogonal para comparar los tratamientos con y sin micorriza no presentó diferencia estadística significativa.

Tabla 16. Cuadrados medios del análisis de varianza para el ensayo de aclimatación con raíces Tipo B.

Fuente de variación	Grados de libertad	Tamaño de la Planta	Área foliar promedio	N° de hojas nuevas	N° de hojas muertas
Bloque	4	0,37ns	0,034ns	0.025ns	0,02ns
Tratamiento	5	0,12ns	0,019ns	0.085*	0,01ns
Tapado Vs Destapado	1	0.282 ns	0.075 ns	0.035 ***	0.012 ns
Sin M. Vs Con M.	1	0.034 ns	0.002 ns	0.001 ns	0.002 ns
Error	12	0,15	0,075	0.024	0,04
Promedio real		39,5	16,2	8.6	1,5
Coeficiente de variación (%)		16,29	13,99	9.4	19,09
Homogeneidad		381,96***	108,06***	12.0ns	80.0***
Normalidad		0,96ns	0,94ns	0,96ns	0,95ns

* Diferencia estadística significativa a nivel del 5%

** Diferencia estadística significativa a nivel del 1%

* ** Diferencia estadística significativa a nivel del 0.1%

ns Diferencia estadística no significativa

Debido a que en la variable número de hojas nuevas se obtuvo diferencia estadística significativa a nivel del 5% entre los tratamientos, a esta se le realizó la prueba de separación de medias de Tukey (Tabla 17) en la que se muestra que el tratamiento con mayor número de hojas nuevas por

planta es T1 (con Micorriza Tapado) con un promedio de 13,4 hojas, en contraste con T4 (sin Micorriza Destapado) que obtuvo un menor promedio en el número de hojas nuevas, con un valor de 5.4 (Grafico 6).

Tabla 17. Promedio por tratamientos para el ensayo de aclimatación, raíces Tipo B.

TRATAMIENTO	TAMAÑO de la PLANTA (cm)	AREA FOLIAR PROMEDIO (cm ²)	NUMERO DE HOJAS NUEVAS	NUMERO DE HOJAS MUERTAS
1	48.4	14.15	13.4 a	1.2
2	28	17.22	6.75 abc	2
3	38.25	13.78	7.00 bc	1
4	31.8	16.11	5.40 c	1.2
5	55.5	14.30	8.50 abc	3
6	46	26.79	12.0 ab	1.5

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales

Se puede observar en la Tabla 16 que el supuesto de homogeneidad de varianzas no se cumple para las variables tamaño de la planta, área foliar, y número de hojas muertas, por lo tanto para ellas es necesario realizar un análisis de varianza no paramétrico (prueba de Friedman) para verificar su comportamiento en este ensayo (Tabla 18).

Grafico 6. Promedio por tratamientos para el ensayo de aclimatación, raíces Tipo B.

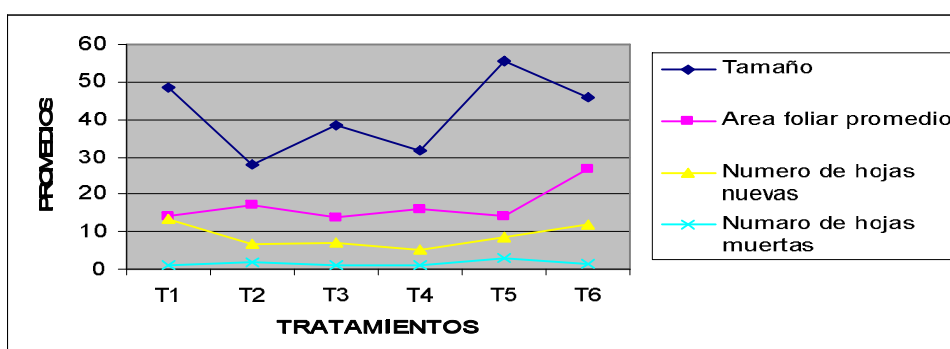


Tabla 18. Cuadrados medios del análisis de varianza no paramétrico para el ensayo de aclimatación con raíces Tipo B.

Fuente de variación	Grados de libertad	Tamaño de la Planta	Área foliar promedio	N° de hojas muertas
Bloque	4	2,36ns	2,36ns	1,50ns
Tratamiento	5	3,4ns	0,64ns	1,46ns
Error	12	2,37	3,52	2,54

* Diferencia estadística significativa a nivel del 5%

** Diferencia estadística significativa a nivel del 1%

*** Diferencia estadística significativa a nivel del 0.1%

ns Diferencia estadística no significativa

El análisis de varianza no paramétrico (Tabla 18), muestra que efectivamente no hay diferencia estadística significativa ni entre los bloques, ni entre los tratamientos para las variables tamaño de la planta, área foliar y número de hojas muertas, pero aunque no existe diferencia significativa entre estas variable, en la Tabla 17 podemos observar que para la variable tamaño, T5 (control Tapado) muestra el mayor promedio con 55.5 cm siendo T2 (con Micorriza Destapado) quien presenta el menor valor promedio, con 28 cm. En la variable área foliar promedio, T6 (control Destapado) alcanza el mayor valor promedio (26.79 cm²) y T3 (sin Micorriza Tapado) el menor (13.78 cm²). En el caso del número de hojas muertas, T5 (control Tapado) presenta el mayor valor promedio (1.5), en contraste con T3 (sin Micorriza Tapado), con valor de 3.0.

El contraste ortogonal para la variable número de hojas nuevas, muestra que existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos tapados y destapados (Tabla 16), presentando los tratamientos tapados un mejor promedio con 10.18 hojas por planta, en comparación con los tratamientos destapados cuyo promedio es de 7.09 hojas nuevas por planta (Tabla 19).

Tabla 19. Promedio de los tratamientos Tapados y Destapados en el ensayo de aclimatación con raíces Tipo B.

GRUPO	TAMAÑO de la Planta (cm)	AREA FOLIAR PROMEDIO (cm ²)	Nº HOJAS NUEVAS	Nº HOJAS MUERTAS
Tapado	46.00 a	14.03 a	10.18 a	1.42 a
Destapado	33.00 a	18.45 a	7.09 b	1.58 a

Promedios con la misma letra son estadísticamente iguales

Tras la culminación del proceso de aclimatación, estas plantas fueron llevadas a campo, en donde se les proporcionaron las condiciones necesarias para su desarrollo, ver figura 16.

Figura 16. Plantas de *Dioscorea cayenensis* a la 4^a semana de su transplante a campo en la vereda Los Pérez, zona rural del municipio de Sampués -Sucre.



8. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

8.1 FASE DE ENRAIZAMIENTO

Es ampliamente conocido que la presencia de hojas en los segmentos nodales, ejerce una fuerte influencia, estimulando la iniciación de raíces.

La traslocación de carbohidratos desde las hojas sin duda contribuye a la formación de raíces, sin embargo, la mayor promoción del enraizamiento por efecto de las hojas y yemas es, posiblemente, resultado de otros factores más directos (Breen y Muraoka, 1974). Hojas y yemas, son conocidas como poderosos centros productores de auxinas, y los efectos son observados directamente por debajo de ellos, demostrando el transporte polar, desde el ápice a la base. Estacas de ciertas especies son fácilmente enraizadas, mientras que estacas de otras enraízan con mayor dificultad (Hartmann, et. al., 1992)

En la fase de enraizamiento, la plántula está equipada con tallo, hojas y yemas axilares, arquitectura necesaria para que comience a sintetizar sus propias auxinas, por lo que muchas de éstas comienzan a desarrollar un sistema radicular en ausencia de auxina exógena. (Pérez y Brun, 2003). De acuerdo con esto, se concluye que la producción de raíces en los tratamientos control se dio por acción de auxinas endógenas. Además, sabemos que la mayor parte de las plantas necesitan auxinas para conseguir una regeneración radical eficaz, pero esta necesidad no es constante, ya que después de la iniciación de la raíz (evento para el cual se necesitan elevadas concentraciones), el desarrollo de los primordios radicales requiere una baja concentración (Pierrick, 1991).

Existe una conocida influencia de diversos factores físicos en la formación *in vitro* de raíces tales como el suministro de oxígeno, el cual es importante, ya que por esta razón los esquejes enraizan mejor *in vivo* que

in vitro. La aireación suele promover la formación de raíces y el enraizamiento es mejor en medio líquido que sólido (Kothari, 1984). De igual manera, la luz generalmente tiene un efecto negativo sobre la formación de raíces, tanto es así que plantas que han sido cultivadas en la oscuridad, enraizan con más facilidad que las cultivadas en presencia de luz (Kothari, 1984).

Respecto a la diferencia encontrada entre los bloques a diferentes intensidades lumínicas, se sabe que la luz puede controlar la fotomorfogénesis mediante varios mecanismos. Es posible que el fitocromo cercano a la membrana plasmática provoque cambios que incrementan el influjo (o a veces el flujo) de Ca^{2+} y que esta señal se utilice en un proceso de transducción para la activación de genes que controlan la organogénesis vegetal (Salisbury, 1994). Es posible que las condiciones de luminosidad del bloque 5 hayan influenciado a dicho fitocromo de una manera diferencial con respecto a los demás bloques, favoreciendo el desarrollo de raíces primarias y secundarias, hojas y nudos nuevos.

En estudios realizados con papa, (Hayashi, et. al., 1991), se encontró que la luz indirecta promueve el crecimiento *in vitro* de dicha planta, estos investigadores obtuvieron una relación tallo/raíz menor en los tratamientos sometidos a luz indirecta en comparación con los controles que se encontraban bajo luz directa, en donde obtuvieron una relación tallo/raíz mayor. Esto nos indica que la luz indirecta hace que en la papa *in vitro* se desarrolle más la raíz que el tallo.

Según lo anterior, podemos afirmar que para inducir una mayor producción de raíces *in vitro*, se puede hacer el montaje del proceso en estantería con luz indirecta, lo que reduciría el uso de lámparas con luz día, disminuyendo así el consumo de energía eléctrica y por ende, el costo del mantenimiento de estas *in vitro* plantas en el laboratorio. Además,

se sabe que la exposición a la luz reduce la tasa de crecimiento *in vitro* en el camote o batata (*Ipomoea batatas*), y en plantas así expuestas se han encontrado bajas concentraciones de AIA y altas concentraciones de AIA-oxidasa en las raíces de almacenamiento. (Jimenes, 1983).

También podemos agregar que existen cofactores que ayudan a promover la formación de raíz tales como la biotina, los productos terpenlactónicos y los fenólicos, pero la aplicación exógena de éstos, inhiben el desarrollo de la raíz (Bassuk, et. al., 1981 y Fald, 1967). Las relaciones entre los fenoles y la rizogénesis inducida por la auxina pueden ser muy variadas, en algunas ocasiones actúan como cofactores rizogénicos, apoyando la fase de iniciación radicular y en otras dependiendo de la calidad y cantidad en que se encuentren pueden influir sobre la oxidación de la auxina (Zobel y Albert, 1994).

Es por esto que podemos decir que una de las causas posibles en el desarrollo radicular de *D. cayenensis* en presencia o ausencia de auxina exógena, se pudo dar por acción de productos fenólicos endógenos, ya que ésta especie presenta un alto nivel de fenolización (Pérez y Brun, 2003) *in vitro*, aun en presencia de antioxidantes como el carbón activado.

8.2 FASE DE ACLIMATACIÓN

En esta etapa, y con el protocolo propuesto en este trabajo, se obtuvieron excelentes resultados al mantener las plántulas en un microambiente tapado durante las primeras semanas de su adaptación, ya que al desarrollar mas raíces, nuevos brotes y aumentar la resistencia a la desecación y al ataque de patógenos, las plantas se volvieron totalmente autótrofas (Hartmann y Kester, 1987) en contraste a los resultados

obtenidos por Ortega y Álvarez en el 2001 para la aclimatación de yuca en la que se tuvo que hacer una “pre-aclimatación” *in vitro* utilizando tapas de cristaflex en lugar de las de papel aluminio, con lo cual obtuvieron un porcentaje de mortalidad tres veces menor con las plantas provenientes de frascos tapados con cristaflex en comparación con las plantas provenientes de frascos tapados con papel aluminio.

Las plantas producidas *in vitro*, poseen un nivel de estomas bastante bajos y poco funcionales, lo que hace que sean incapaces de cerrarse en condiciones de humedad relativa baja (Sutter y Langhans, 1979), permitiendo de este modo la entrada de CO₂ y la pérdida de agua debido a la transpiración (Ville, 1988), por lo cual hay que mantenerlas en una microcamara que corresponde a un vaso de icopor tapado, y con riego asperjado durante las primeras semanas de aclimatación con el fin de proporcionarles una humedad relativa alta y evitar de este modo el posterior estrés por desequilibrio de las funciones bioquímicas y fisicoquímicas de la planta.

También es bien sabido que durante el periodo inicial de la aclimatación de vitroplantas de cualquier especie vegetal, son necesarias varias condiciones ambientales. Una de ellas es el mantenimiento de la humedad relativa alta (del 50 al 100%) durante dos o tres semanas para proteger a la planta de la desecación y permitir que inicie nuevas raíces y brotes. El segundo requerimiento es un sustrato aireado, bien drenado, que permita que las raíces se desarrollen con rapidez. Otra condición es la protección contra diversos patógenos hasta que la planta haya adquirido algo de resistencia (Howard y Oehl, 1981). Es por esto quizá que se obtuvo diferencia estadística significativa en la fase de aclimatación en favor de las plantas expuestas al ambiente tapado, en contraste con el ambiente destapado, ya que de esta manera, dichas plantas se mantuvieron bajo las condiciones ambientales favorables antes mencionadas, y sometidas a condiciones mínimas de estrés ambiental.

Las micorrizas son importantes en la supervivencia y crecimiento de muchas especies de frutales micropropagadas: Durazno, piña, aguacate, uva, plátano, banano y yuca. No hay reportes a nivel mundial de utilización de micorrizas en especies de ñame (*Dioscorea*). (Corredor, 2000).

Adicionalmente, en la fase de aclimatación de *vitro* plantas de *Dioscorea cayenensis*, el efecto de la inoculación de hongos micorrizógenos, que para este caso provenían de una marca comercial (MYCORAL®), no fue evidenciado, posiblemente porque el producto utilizado tiene reportes de su utilización en especies nativas, frutales, café, banano, plátano, hortalizas, ornamentales, caña, caña panelera, palma africana y pastos de corte, pero no hay reportes de estudios de su utilización en especies de ñame. Además, este producto está compuesto por sustrato de suelo de textura franca y un “pool” de esporas, hifas y raicillas de varias especies de micorrizas de los géneros *glomus*, *acaulospora* y *entrophospora*, provenientes de suelos nativos de la región del Valle del Cauca-Colombia, y es posible que dichas especies no sean eficaces en la colonización de raíces del género *Dioscorea* en la zona de estudio.

9. CONCLUSIONES

- El enraizamiento *in vitro* de plantas de *D. cayenensis*, no se vio influenciado por ninguna de las concentraciones de los reguladores de crecimiento evaluados (AIA, ANA, AIB Y 2.4 – D).
- La aclimatación *in vivo* de *D. cayenensis*, se puede realizar ya sea con raíces tipo A o con raíces tipo B (raíces obtenidas *in vitro* a las 10 y 6 semanas en fase de enraizamiento respectivamente) sin que esto afecte negativamente su desarrollo.
- La aclimatación de *in vitro* plantas de ñame amarillo resulta ser eficiente con raíces Tipo B (obtenidas durante 6 semanas en fase de enraizamiento), por la disminución del tiempo de producción y por ende la reducción en los costos de producción de las plantas.
- El tamaño de la planta, el número de hojas nuevas y el número de hojas muertas en la aclimatación de *D. cayenensis* no varía por el hecho de estar o no en un sustrato suplementado con MYCORAL®, pero estas variables si se ven afectadas por el hecho de estar en un micro ambiente tapado o destapado.
- La aclimatación de plantas de *Dioscorea ceyenensis* producidas *in vitro*, es más eficiente utilizando un ambiente tapado durante las primeras 5 semanas de adaptación.
- El área foliar promedio en la aclimatación de plantas *D. cayenensis* no varió por la presencia o ausencia de inóculos de MYCORAL® en el sustrato ni por estar en ambientes tapado o destapado.

- El método de aclimatación en casa malla, demostró ser eficiente en el proceso de adaptación de plantas *in vitro* de *D. cayenensis*, libres de plagas y enfermedades y con un alto porcentaje de supervivencia (95 % de las plantas).
- Los resultados de esta investigación indican que es posible aclimatar *in vitro* plantas de *Dioscorea cayenensis* en casa malla, para llevarlas al campo y poder obtener, de esta manera, plantaciones de esta especie promisorias, con buenas condiciones fitosanitarias y excelente rendimiento.
- Mediante la metodología propuesta en este trabajo, es posible alcanzar un adecuado enraizamiento *in vitro* de plantas de *D. cayenensis*, lograr su aclimatación y establecimiento en condiciones de invernadero, para su fácil adaptación a condiciones *in vivo* o de campo.

10. RECOMENDACIONES

- ☉ Realizar pruebas para la fase de enraizamiento, en donde se evalúe el efecto de medios de cultivo liquido, semi-liquido y sólido en la producción de raíces, con el fin de contribuir al desarrollo de la técnica de cultivo *in Vitro* para esta especie de ñame, poco cultivada en el país y de la cual existe poca información.
- ☉ Aislar y caracterizar los productos fenólicos producidos *in Vitro* por *Dioscorea cayenensis*, con el fin de evaluar el efecto en su enraizamiento *in Vitro*.
- ☉ Utilizar intensidad lumínica entre 3.8 y 4.3 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ suministrada de forma indirecta en el enraizamiento *in vitro* de *Dioscórrea cayenensis* ya que esta favorece un mejor desarrollo radicular primario al igual que la producción de hojas y nudos nuevos
- ☉ Determinar el efecto de inóculos de micorrizas nativas, en la aclimatación *in vivo* de *Vitro* plantas enraizadas de *D. cayenensis*, y su efecto en el desarrollo de plantas en campo.

- Evaluar el desarrollo en campo de plantas aclimatadas de *Dioscorea cayenensis*, con el fin de estimar valores de producción y rendimiento por hectárea de estos cultivares para la región caribe Colombiana y su respuesta al ataque de plagas y/o enfermedades.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABANG, M. M. 2003. Genetic Diversity of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. Causing Anthracnose Disease of Yam (*Dioscorea spp.*) in Nigeria.

ACOSTA, C. 1980. El cultivo del ñame. Bogotá: TOA, 75p, il.

AGUAS, A. GAMERO, G. ROMERO, J Y ESPITIA, A. 2000. Aclimatación de plantas *in Vitro* de ñame espino, japonico y chocono en la costa caribe. En: Ñame: Producción de semillas por Biotecnología, pp 102-112.

ALVAREZ, A. 2000. Prácticas agronómicas para el cultivo de ñame. Universidad de Córdoba. Montería. En: Ñame: producción de semillas por biotecnología. Pp. 33-39.

AMMIRATO, P.V. 1983. Handbook of Plant Cell Culture Yam. Tomo 4. MacMillan Publishing CO, New York, pp. 327-355.

AMMIRATO, P.V. 1984. Yams. In: Handbook of Plant Cell Culture. Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W. and Yamada Y. (eds.) Vol 3. MacMillan, New York, pp. 327-354.

APPLEZWIRIG, N. 1997. *Dioscorea* the Pill Crop. In: Crop Resources (D.S. Seigler. Ed). Academic Press. New York. Pp. 149-163.

ARSENCIO, J. 1985. Determinación del área foliar en plantas de caraota (*Phaseolus vulgaris*), yuca y batata, utilizando dimensiones lineales y de peso seco de las hojas. Turrialba 35 (1): 55-64.

ASIEDU, J. J. 1986. Processing and Physical chemical properties of tropical products. Pfaffenwiler: Centaurus-Verlagsgesellschaft, pp. 379-389.

BASSUK, N.L y HOWARD, B.H. 1981. Jour. Hort. Science, 56: 301-312.

BREEN, P. J. y MURAOKA, T. 1974. Effect of leaves and carbohydrate content and movement of ¹⁴C- assimilate in plum cuttings. Jour.Amer. Soc. Hort. Sci. 99(4):326-32.

CHARLES, W. B. y ONWBEME, I. C. 1994. Tropical root and tuber crops production, perspectives and future prospects. FAO Plant Production and Protection Paper. Roma. ISSN 0259-2517. ISSN 95-5-103461-3.

CONLAN, S; L A De Griffiths; TURNER, M.; FIDO, R.; TATHAM, A.; AINSWORTH, C.; SHEWRY, P. 1998. Caracterización de la proteína de almacenaje dioscorina de los tubérculos de ñame. Diario de la Fisiología de Planta 153 (1-2): 25-31. ISSN: 0176-1617.

CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL. 1999. ¿Puede el sector hortofrutícola contribuir al plan de exportaciones? Exótica, Boletín CCI, Enero-Marzo, Año 3, Vol. 9.

CORREDOR, G. 2000. Micorizas arbusculares. Aplicación para el manejo sostenible de los agroecosistemas. Disponible en Internet: URL: <http://www.turipana.org.co/micorrizas.htm>

COURSEY, G. y COURSEY, K. 1971. The New Yam Festival of West África. *Anthropos Stud.* 66: 44-454.

FALD, M.S. y H.T. HARTMAN. 1967. *Plant Physiol.* 42:541-549.

FAO. 1996. *Far FAO production yearbook.* Roma, Italy.

GONZÁLEZ, A. KAISMAN, J. y AGUIRRE, M. 1999. Argentina. Hormonas Vegetales. Disponible en Internet: URL: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/planta/auxina.htm>.

HARTMANN, H.T. KESTER, D. E. y DAVIES, F.T. 1992. *Plant Propagation. Principles and Practices.* Fifth Edition.

HARTMANN. H.T y KESTER D. E. 1987. *Propagación de plantas, principios y técnicas.* México: Compañía Editorial Continental. 760 p.

HAYASHI, M. KOZAI, T. y OCHIAI, M. 1991. Effect of the sideways lighting on the growth and morphology of potato plants *in vitro*. *J. Jap. Soc. for Hort. Sci.* 60: 228-229.

HOWARD, B.H, y OEHL. V.H. 1981. Improved establishment of *in vitro* propagated plum micropropagules following treatment with GA₃ or prior chilling. *Jour. Hort. Sci.* 56(1): 1-7.

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI. 1998. Estudio general de suelos y zonificación de tierras. Departamento de Sucre. Ministerio de hacienda y crédito público. Santa Fé de Bogotá. Pag 27-71.

JIMENES, J. GARNER J. 1983. Phytton. Argentina. 43: 117-124.

KOTHARI. 1984. IN VITRO PROPAGATION OF AFRICAN MARIGOLD. Hort. Science. 11:175.

KRIKORIAN, A. 1982. Cloning of higher plants from aseptically cultured tissues and cells. Biol. Rev. 57:151-218.

MINISTERIO DE AGRICULTURA. 1997. Programas Agrícolas. Oficina de Planeación del sector Agropecuario. Pp. 235-240.

MITCHELL, A.S. ASEMOTA, N.H. y MOHAMMAD, H.A. 1995. Factors Affecting the In-Vitro Establishment of Jamaican Yams (*Dioscorea spp*) from Nodal Pieces. Sci Food Agric 1995, 67: 541-550.

MONTALDO, A. 1983. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica, 284 pp.

ORTEGA. R y ALVEREZ. D. 2001. Micropropagación *in vitro* de la yuca (*Manihot esculenía crantz*) variedad venezolana, utilizando la técnica de segmentos nodales. Tesis de grado. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con énfasis en Biotecnología. Universidad de Sucre. Sincelejo.

OSORIO, J. y RAMÍREZ, B. 1989. Principales enfermedades de ñame en

la región Caribe colombiana. ICA Informa Vol 23 No. 1: 13-19.

PEREA, M. Y BUITRAGO, G. 2000. Aplicación de la Biotecnología Agrícola al cultivo de ñame. En: Ñame: Producción de semillas por Biotecnología, pp. 17-32.

PÉREZ, W. Y BRUN, A. 2003. Aplicación de la técnica *in vitro* para la propagación de *Dioscorea cayenensis* Cv "Ñame Amarillo a partir de segmentos nodales. Tesis de grado. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con énfasis en Biotecnología. Universidad de Sucre. Sincelejo.

PIEREIK R.L.M. 1991. BIOTECNOLOGIA Editorial Síntesis. Madrid.

PINEDO, M. 1975. Estudio sobre un clon de *pituca* (*Colocassia esculenta*). Calidad de su harina en la Panificación. Tesis. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Iquitos. Perú.

RICHARDS, S. J, WARNEKE, J.E y ALJIBURY. F. K. 1964. Physical properties of soil mixes used by nurseries. Calif. Agr. 18(5):12-13.

RODRÍGUEZ, C. 2002. Cultivo *in vitro* de ñame (*Dioscórrea alata*) Cv. "pico de botella" a partir de segmentos nodales. Tesis de grado. Facultad de Educación y Ciencias. Programa de Biología con énfasis en Biotecnología. Universidad de Sucre. Sincelejo.

ROJAS GARCIDUEÑAS, M. y RAMÍREZ, H. 1993. Control Hormonal del Desarrollo de las Plantas. Limusa. 2^{da} edición. México. 263p.

ROJAS GARCIDUEÑAS, M.; RUIZ, M. A. y CARRILLO J. 1962. Weeds 10:69-71.

SALISBURY, F. B. Ross, C. W. 1994. Fisiología Vegetal. Grupo editorial Iberoamérica. México. Pag 514.

SUTTER. E y LANGHANS. R.W. 1979. Epicuticular was formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. En: J. Am. Soc. Hort. Sci. N° 104., p. 493-496.

THIMANN, K.V. 1937. Amer. Jour. Bot. 24:407-412.

THURSTON, H. D. 1998. Tropical Plant Diseases. 2th Edition. APS PRESS.

TODAY'S MARKET PRICES. 2002. Disponible en Internet: URL: <http://www.todaymarket.com/cgi-bin/tmpterm.cgi/term.htm>.

TORREY, J.G. 1967. Development in Flowering Plants. McMillan, New York.

URPAS, 2001. Anuario estadístico del sector agropecuario (1999-2000). Ministerio de Agricultura. Bogotá D.C. pp.51-53.

VENEGAS, L. 2002. Barranquilla. Lalvi y Cia. Ltda. Proyecto de Ñame Amarillo. Disponible en internet: URL: <http://angelfire.com/ab6/yam>.

Ville.C.H. 1988. Biología: Editorial Interamericana. 7ª *ed*, México. 875 p.

ZOBEL, B. y J. T ALBERT. 1994. Técnicas de Mejoramiento Genético de Árboles Forestales. Editorial Limusa S.A., México. 545 pp.

ZURFLUH, L.L. y GUILFOYLE, T.J. 1982. Plant Physiol. 69: 332-337.

ANEXOS

1. Análisis del ensayo de enraizamiento mediante programa estadístico SAS.

Análisis del ensayo de enraizamiento 308
09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
BLOQUE	5	1 2 3 4 5

TRATAMIENTOS 15: 2,4-D 0,1mg/L , 2,4-D 0,2mg/L , 2,4-D 0,4mg/L, 2,4-D 0,8mg/L, AIA 1mg/L, AIA 2mg/L, AIA 4mg/L, AIB 0,1mg/L, AIB 0,5mg/L, AIB 1,0mg/L , AIB 2,0mg/L, ANA 0,4mg/L, ANA 0,8mg/L, ANA 1,2mg/LCONTROL

Number of observations 75

NOTE: All dependent variables are consistent with respect to the presence or absence of missing values. However only 72 observations can be used in this analisis.

Análisis de ensayo de enraizamiento 309
09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Dependent Variable: N° RAICES 1ª

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	18	0.87083219	0.04837957	1.56	0.1054
Error	53	1.64061428	0.03095499		
Corrected Total	71	2.51144646			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	NºRAICES 1ª Mean
0.346745	13.16599	0.175940	1.336324

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	4	0.34078844	0.08519711	2.75	0.0374
TRATAMIENTO	14	0.53004375	0.03786027	1.22	0.2872

análisis de ensayo de enraizamiento 310
09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nº RAICES 2ª

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	18	7.16773525	0.39820751	1.09	0.3890
Error	53	19.39928829	0.36602431		
Corrected Total	71	26.56702354			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	NºRAICES 2ª Mean
0.269798	29.28603	0.604999	2.065829

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	4	2.73457901	0.68364475	1.87	0.1298
TRATAMIENTO	14	4.43315624	0.31665402	0.87	0.5988

análisis de ensayo de enraizamiento 311
09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nº TOTAL RAICES

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	18	6.29549490	0.34974972	1.15	0.3366

Error	53	16.15166580	0.30474841
-------	----	-------------	------------

Corrected Total	71	22.44716069
-----------------	----	-------------

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Nº TOTAL RAICES Mean
0.280458	25.44302	0.552040	2.169712

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	4	2.17110701	0.54277675	1.78	0.1464
TRATAMIENTO	14	4.12438788	0.29459913	0.97	0.4983

análisis de ensayo de enraizamiento 312
09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Dependent Variable: LARGO RAICES 1ª

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	18	1.29873279	0.07215182	1.10	0.3788
Error	53	3.47903818	0.06564223		
Corrected Total	71	4.77777097			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	LARGO RAICES 1ª Mean
0.271828	15.15518	0.256207	1.690560

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	4	0.40838165	0.10209541	1.56	0.1998
TRATAMIENTO	14	0.89035113	0.06359651	0.97	0.4963

análisis de ensayo de enraizamiento 313
09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nº HOJAS NUEVAS

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	----------------	-------------	---------	--------

Model	18	1.18268317	0.06570462	1.49	0.1312
Error	53	2.33719852	0.04409809		
Corrected Total	71	3.51988169			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Nº HOJAS NUEVAS Mean
0.336001	15.44881	0.209995	1.359299

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	4	0.53669979	0.13417495	3.04	0.0249
TRATAMIENTO	14	0.64598338	0.04614167	1.05	0.4250

análisis de ensayo de enraizamiento 314

09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Dependent Variable: Nº NUDOS NUEVOS

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	18	1.20440614	0.06691145	1.40	0.1724
Error	53	2.53952710	0.04791561		
Corrected Total	71	3.74393324			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Nº NUDOS NUEVOS Mean
0.321695	16.24776	0.218896	1.347240

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	4	0.52256632	0.13064158	2.73	0.0388
TRATAMIENTO	14	0.68183983	0.04870284	1.02	0.4519

análisis de ensayo de enraizamiento 315

09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for N° RAICES 1ª

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	53
Error Mean Square	0.030955
Critical Value of Studentized Range	5.02859
Minimum Significant Difference	0.4054
Harmonic Mean of Cell Sizes	4.761905

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATAMIENTO
A	1.4844	4	ANA 0,8mg/L
A			
A	1.4489	5	ANA 0,4mg/L
A			
A	1.4112	5	AIB 1,0mg/L
A			
A	1.4033	5	2,4-D 0,2mg/L
A			
A	1.3965	4	AIA 1mg/L
A			
A	1.3900	4	AIB 0,5mg/L
A			
A	1.3414	5	2,4-D 0,1mg/L
A			
A	1.3414	5	AIB 0,1mg/L
A			
A	1.3394	5	ANA 1,2mg/L
A			
A	1.3172	5	CONTROL
A			
A	1.3069	5	2,4-D 0,8mg/L
A			
A	1.2821	5	AIB 2,0mg/L
A			
A	1.2429	5	2,4-D 0,4mg/L
A			
A	1.2413	5	AIA 2mg/L

A			
A	1.1506	5	AIA 4mg/L

análisis de ensayo de enraizamiento

316

09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for N° RAICES 2ª

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	53
Error Mean Square	0.366024
Critical Value of Studentized Range	5.02859
Minimum Significant Difference	1.3942
Harmonic Mean of Cell Sizes	4.761905

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATAMIENTO
A	2.5205	5	AIB 1,0mg/L
A			
A	2.3345	5	ANA 1,2mg/L
A			
A	2.2317	5	2,4-D 0,2mg/L
A			
A	2.2253	5	2,4-D 0,8mg/L
A			
A	2.2016	4	ANA 0,8mg/L
A			
A	2.1824	5	ANA 0,4mg/L
A			
A	2.1657	4	AIA 1mg/L
A			
A	2.1211	4	AIB 0,5mg/L
A			
A	2.1065	5	AIB 0,1mg/L

A			
A	2.0284	5	2,4-D 0,1mg/L
A			
A	1.9764	5	AIB 2,0mg/L
A			
A	1.8702	5	AIA 2mg/L
A			
A	1.8255	5	CONTROL
A			
A	1.6866	5	2,4-D 0,4mg/L
A			
A	1.5694	5	AIA 4mg/L

análisis de ensayo de enraizamiento 317
 09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for N° TOTAL RAICES

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	53
Error Mean Square	0.304748
Critical Value of Studentized Range	5.02859
Minimum Significant Difference	1.2721
Harmonic Mean of Cell Sizes	4.761905

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATAMIENTO
A	2.5815	5	AIB 1,0mg/L
A			
A	2.4017	5	ANA 1,2mg/L
A			
A	2.3232	5	ANA 0,4mg/L
A			
A	2.3143	5	AIB 0,1mg/L
A			
A	2.3122	5	2,4-D 0,8mg/L
A			

A	2.3092	5	2,4-D 0,2mg/L
A			
A	2.3009	4	ANA 0,8mg/L
A			
A	2.2557	4	AIA 1mg/L
A			
A	2.2047	4	AIB 0,5mg/L
A			
A	2.1245	5	2,4-D 0,1mg/L
A			
A	2.0663	5	AIB 2,0mg/L
A			
A	1.9715	5	AIA 2mg/L
A			
A	1.9661	5	CONTROL
A			
A	1.7748	5	2,4-D 0,4mg/L
A			
A	1.6895	5	AIA 4mg/L

análisis de ensayo de enraizamiento 318
09:15 Sunday, April 15, 2001

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for LARGO RAICES 1^a

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	53
Error Mean Square	0.065642
Critical Value of Studentized Range	5.02859
Minimum Significant Difference	0.5904
Harmonic Mean of Cell Sizes	4.761905

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATAMIENTO
A	1.8419	5	2,4-D 0,8mg/L
A			
A	1.8396	5	AIB 2,0mg/L

A				
A	1.8021	5	AIB 0,1mg/L	
A				
A	1.7746	5	AIB 1,0mg/L	
A				
A	1.7490	5	2,4-D 0,1mg/L	
A				
A	1.7259	5	2,4-D 0,2mg/L	
A				
A	1.7236	5	ANA 1,2mg/L	
A				
A	1.7200	4	AIA 1mg/L	
A				
A	1.6852	4	AIB 0,5mg/L	
A				
A	1.6531	5	CONTROL	
A				
A	1.6483	5	AIA 2mg/L	
A				
A	1.6254	5	ANA 0,4mg/L	
A				
A	1.6043	4	ANA 0,8mg/L	
A				
A	1.4993	5	2,4-D 0,4mg/L	
A				
A	1.4538	5	AIA 4mg/L	
análisis de ensayo de enraizamiento				319
09:15 Sunday, April 15, 2001				

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for N° HOJAS NUEVAS

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	53
Error Mean Square	0.044098
Critical Value of Studentized Range	5.02859
Minimum Significant Difference	0.4839
Harmonic Mean of Cell Sizes	4.761905

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATAMIENTO
A	1.4710	5	ANA 0,4mg/L
A			
A	1.4605	4	ANA 0,8mg/L
A			
A	1.4489	5	AIB 2,0mg/L
A			
A	1.4125	5	2,4-D 0,4mg/L
A			
A	1.4112	5	AIB 1,0mg/L
A			
A	1.4006	4	AIA 1mg/L
A			
A	1.3988	5	AIB 0,1mg/L
A			
A	1.3918	5	2,4-D 0,1mg/L
A			
A	1.3678	5	ANA 1,2mg/L
A			
A	1.3678	4	AIB 0,5mg/L
A			
A	1.3414	5	2,4-D 0,2mg/L
A			
A	1.3304	5	AIA 2mg/L
A			
A	1.2978	5	CONTROL
A			
A	1.1686	5	2,4-D 0,8mg/L
A			
A	1.1506	5	AIA 4mg/L
análisis de ensayo de enraizamiento			320
09:15 Sunday, April 15, 2001			

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for N° NUDOS NUEVOS

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	53
Error Mean Square	0.047916
Critical Value of Studentized Range	5.02859

Minimum Significant Difference 0.5044
Harmonic Mean of Cell Sizes 4.761905

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	TRATAMIENTO
A	1.4772	5	AIB 2,0mg/L
A			
A	1.4313	5	ANA 0,4mg/L
A			
A	1.4112	5	AIB 1,0mg/L
A			
A	1.4069	5	2,4-D 0,4mg/L
A			
A	1.4067	4	ANA 0,8mg/L
A			
A	1.4006	4	AIA 1mg/L
A			
A	1.3891	5	2,4-D 0,1mg/L
A			
A	1.3855	5	ANA 1,2mg/L
A			
A	1.3694	5	AIB 0,1mg/L
A			
A	1.3402	4	AIB 0,5mg/L
A			
A	1.3304	5	AIA 2mg/L
A			
A	1.3112	5	2,4-D 0,2mg/L
A			
A	1.2737	5	CONTROL
A			
A	1.1988	5	2,4-D 0,8mg/L
A			
A	1.0974	5	AIA 4mg/L

analisis de ensayo de enraizamiento 321

prueba de normalidad 09:15 Sunday, April 15, 2001

XTIT

----- ENSAYO=Enraizamiento -----

Obs variable normal prob rechazo

1	Nº HOJAS NUEVAS	0.99006	0.84630
2	LARGO RAICES 1ª	0.98834	0.74956
3	Nº RAICES 1ª	0.98553	0.58024
4	Nº RAICES 2ª	0.98478	0.53678
5	NUDOS NUEVOS	0.98860	0.76478
6	TOTAL RAICES	0.98582	0.59761

análisis de ensayo de enraizamiento 322
prueba de f maxima de homogeneidad
XTIT 09:15 Sunday, April 15, 2001

----- ENSAYO=Enraizamiento -----

Obs	variable	f max	rechazo
1	Nº HOJAS NUEVAS	15.798	
2	LARGO RAICES 1ª	106.787	***
3	Nº RAICES 1ª	23.639	
4	Nº RAICES 2ª	19.737	
5	Nº NUDOS NUEVOS	86.834	***
6	TOTAL RAICES	20.427	

2. Prueba LSD por bloques para el ensayo de enraizamiento.

análisis de ensayo de enraizamiento 502

t Tests (LSD) for Nº RAICES 1ª
Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 53
Error Mean Square 0.030955
Critical Value of t 2.00575
Least Significant Difference 0.1316
Harmonic Mean of Cell Sizes 14.38356

t Grouping	Mean	N	BLOQUE
A	1.41031	14	5
A	1.38376	14	1
A	1.37798	15	3
B A	1.28169	15	2
B	1.22881	14	4

t Tests (LSD) for N° RAICES 2ª

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	53
Error Mean Square	0.366024
Critical Value of t	2.00575
Least Significant Difference	0.4525
Harmonic Mean of Cell Sizes	14.38356

t Grouping	Mean	N	BLOQUE
A	2.4118	14	5
B A	2.1613	15	3
B	1.9361	14	4
B	1.9176	14	1
B	1.9069	15	2

t Tests (LSD) for N° TOTAL RAICES

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	53
Error Mean Square	0.304748
Critical Value of t	2.00575
Least Significant Difference	0.4129
Harmonic Mean of Cell Sizes	14.38356

t Grouping	Mean	N	BLOQUE
A	2.4783	14	5
B A	2.2483	15	3
B A	2.0862	14	1
B	2.0273	14	4
B	2.0140	15	2

t Tests (LSD) for LARGO RAICES 1ª

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	53
Error Mean Square	0.065642
Critical Value of t	2.00575
Least Significant Difference	0.1916
Harmonic Mean of Cell Sizes	14.38356

t Grouping	Mean	N	BLOQUE
A	1.77620	14	4
B A	1.74349	14	5
B A	1.71664	15	3
B A	1.65724	15	2
B	1.55974	14	1

t Tests (LSD) for Nª HOJAS NUEVAS

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 53
 Error Mean Square 0.044098
 Critical Value of t 2.00575
 Least Significant Difference 0.1571
 Harmonic Mean of Cell Sizes 14.38356

t Grouping	Mean	N	BLOQUE
A	1.48224	14	5
B A	1.40301	15	3
B A C	1.37395	14	4
B C	1.31873	14	1
C	1.22504	15	2

t Tests (LSD) for N° NUDOS NUEVOS

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 53
 Error Mean Square 0.047916
 Critical Value of t 2.00575
 Least Significant Difference 0.1637
 Harmonic Mean of Cell Sizes 14.38356

t Grouping	Mean	N	BLOQUE
A	1.46818	14	5
A	1.38127	14	4
B A	1.36502	15	3
B A	1.32160	14	1
B	1.20876	15	2

3. Análisis combinado del ensayo de aclimatación raíces tipo A y tipo B.

análisis ensayo de aclimatacion 558
 08:36 Sunday, April 29, 2001

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
ensayo	2	Raices tipo A Raices tipo B
BLOQUE	8	1 2 3 4 5 6 7 8

ensayo*tratamiento	5	0.23020326	0.04604065	0.36	0.8748
--------------------	---	------------	------------	------	--------

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ensayo	1	0.49609903	0.49609903	3.84	0.0584
BLOQUE(ensayo)	11	2.44471915	0.22224720	1.72	0.1112
tratamiento	5	2.68592029	0.53718406	4.15	0.0047
ensayo*tratamiento	5	0.23020326	0.04604065	0.36	0.8748

Contrast	DF	Contrast SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tapado-vs-destapado	1	1.50657403	1.50657403	11.65	0.0017
Con-vs-Sin	1	0.12486034	0.12486034	0.97	0.3328

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for BLOQUE(ensayo) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ensayo	1	0.49609903	0.49609903	2.23	0.1633

analisis ensayo de aclimatacion 560
 08:36 Sunday, April 29, 2001

The GLM Procedure

Dependent Variable: Area foliar promedio
Sum of

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	22	1.00293383	0.04558790	0.78	0.7260
Error	34	1.98615938	0.05841645		
Corrected Total	56	2.98909321			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Area foliar Mean
0.335531	11.88742	0.241695	2.033200

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	-----------	-------------	---------	--------

ensayo	1	0.14940479	0.14940479	2.56	0.1190
BLOQUE(ensayo)	11	0.64303938	0.05845813	1.00	0.4659
tratamiento	5	0.13706777	0.02741355	0.47	0.7964
ensayo*tratamiento	5	0.07342189	0.01468438	0.25	0.9362

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr >
F					
ensayo	1	0.15324773	0.15324773	2.62	0.1145
BLOQUE(ensayo)	11	0.59612096	0.05419281	0.93	0.5263
tratamiento	5	0.11688721	0.02337744	0.40	0.8452
ensayo*tratamiento	5	0.07342189	0.01468438	0.25	0.9362

Contrast	DF	Contrast SS	Mean Square	F Value	Pr >
F					
Tapado-vs-destapado	1	0.05584569	0.05584569	0.96	
0.3351					
Con-vs-Sin	1	0.01530056	0.01530056	0.26	0.6121

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for BLOQUE(ensayo) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ensayo	1	0.15324773	0.15324773	2.83	0.1208
analisis ensayo de aclimatacion				561	
08:36 Sunday, April 29, 2001					

The GLM Procedure

Dependent Variable: Numero de hojas nuevas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	22	1.35178481	0.06144476	3.00	0.0020
Error	34	0.69647239	0.02048448		
Corrected Total	56	2.04825720			

R-Square Coeff Var Root MSE Numero de hojas nuevas
Mean

0.659968 8.445508 0.143124 1.694676

Source F	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr >
ensayo 0.5319	1	0.00817162	0.00817162	0.40	
BLOQUE(ensayo) 0.8423	11	0.12754850	0.01159532	0.57	
tratamiento <.0001	5	1.01199400	0.20239880	9.88	
ensayo*tratamiento 0.1048	5	0.20407070	0.04081414	1.99	

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ensayo 0.9149	1	0.01105843	0.01105843	0.54	0.4675
BLOQUE(ensayo) 0.9149	11	0.10365889	0.00942354	0.46	
tratamiento <.0001	5	0.94922609	0.18984522	9.27	
ensayo*tratamiento 0.1048	5	0.20407070	0.04081414	1.99	0.1048

Contrast F	DF	Contrast SS	Mean Square	F Value	Pr >
Tapado-vs-destapado <.0001	1	0.39833043	0.39833043	19.45	
Con-vs-Sin 0.3274	1	0.02022718	0.02022718	0.99	

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for BLOQUE(ensayo) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ensayo	1	0.01105843	0.01105843	1.17	0.3019
analisis ensayo de aclimatacion				562	

08:36 Sunday, April 29, 2001

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for Tamaño

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 11
 Error Mean Square 0.222247
 Critical Value of t 2.20099
 Least Significant Difference 0.2823
 Harmonic Mean of Cell Sizes 27.01754

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	ensayo
A	2.6253	35	Raices tipo A
A			
A	2.4145	22	Raices tipo B
			analisis ensayo de aclimatacion
			563
			08:36 Sunday, April 29, 2001

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for Area foliar promedio

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 11
 Error Mean Square 0.054193
 Critical Value of t 2.20099
 Least Significant Difference 0.1394
 Harmonic Mean of Cell Sizes 27.01754

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	ensayo
------------	------	---	--------

A	2.07379	35	Raices tipo A	
A				
A	1.96862	22	Raices tipo B	
			análisis ensayo de aclimatacion	564
				08:36 Sunday, April 29, 2001

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for numero de hojas nuevas

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	11
Error Mean Square	0.009424
Critical Value of t	2.20099
Least Significant Difference	0.0581
Harmonic Mean of Cell Sizes	27.01754

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	ensayo	
A	1.70417	35	Raices tipo A	
A				
A	1.67957	22	Raices tipo B	
			análisis ensayo de aclimatacion	565
				08:36 Sunday, April 29, 2001

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for Tamaño

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	34
Error Mean Square	0.129354
Critical Value of t	2.03224

Least Significant Difference 0.3837
Harmonic Mean of Cell Sizes 7.255814

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t	Grouping	Mean	N	tratamiento
	A	2.8053	4	Conrol tapado
	A			
	A	2.7903	13	Con. tapado
	A			
B	A	2.6810	12	Sin. tapado
B	A			
B	A C	2.4759	4	Conrol Destapado
B	C			
B	C	2.4034	12	Con. Destapado
	C			
	C	2.2162	12	Sin. Destapado
analisis ensayo de aclimatacion				566
08:36 Sunday, April 29, 2001				

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for Area foliar promedio

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
Error Degrees of Freedom 34
Error Mean Square 0.058416
Critical Value of t 2.03224
Least Significant Difference 0.2579
Harmonic Mean of Cell Sizes 7.255814

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t	Grouping	Mean	N	tratamiento
---	----------	------	---	-------------

A	2.1010	4	Conrol Destapado
A			
A	2.1001	12	Con. Destapado
A			
A	2.0345	12	Sin. Destapado
A			
A	2.0254	12	Sin. tapado
A			
A	2.0140	4	Conrol tapado
A			
A	1.9625	13	Con. tapado

analisis ensayo de aclimatacion 567
 08:36 Sunday, April 29, 2001

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for N° hojas nuevas

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	34
Error Mean Square	0.020484
Critical Value of t	2.03224
Least Significant Difference	0.1527
Harmonic Mean of Cell Sizes	7.255814

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	tratamiento
A	1.85513	13	Con. tapado
A			
A	1.84468	4	Conrol tapado
A			
A	1.74773	12	Sin. tapado
A			
A	1.74656	4	Conrol Destapado
B	1.58749	12	Con. Destapado
B			
B	1.50768	12	Sin. Destapado

análisis ensayo de aclimatación 568
08:36 Sunday, April 29, 2001

The GLM Procedure

Dependent Variable: N° hojas muertas

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	22	0.96472723	0.04385124	1.12	0.3718
Error	36	1.40870226	0.03913062		
Corrected Total	58	2.37342948			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	N° hojas muertas Mean
0.406470	17.13804	0.197815	1.154243

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ensayo	1	0.00314881	0.00314881	0.08	0.7783
BLOQUE(ensayo)	11	0.33664735	0.03060430	0.78	0.6555
tratamiento	5	0.47860180	0.09572036	2.45	0.0524
ensayo*tratamiento	5	0.14632926	0.02926585	0.75	0.5930

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ensayo	1	0.00590151	0.00590151	0.15	
0.7000					
BLOQUE(ensayo)	11	0.32101949	0.02918359	0.75	
0.6886					
tratamiento	5	0.40076725	0.08015345	2.05	
0.0950					
ensayo*tratamiento	5	0.14632926	0.02926585	0.75	
0.5930					

Contrast	DF	Contrast SS	Mean Square	F Value	Pr
----------	----	-------------	-------------	---------	----

> F

Tapado-vs-destapado	1	0.22947569	0.22947569	5.86
0.0206				
Con-vs-Sin	1	0.00191375	0.00191375	0.05
0.8262				

Tests of Hypotheses Using the Type III MS for BLOQUE(ensayo) as an Error Term

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
ensayo	1	0.00590151	0.00590151	0.20	0.6617
					569

08:36 Sunday, April 29, 2001

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for N° hojas muertas

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	11
Error Mean Square	0.029184
Critical Value of t	2.20099
Least Significant Difference	0.0996
Harmonic Mean of Cell Sizes	28.47458

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	ensayo
A	1.16029	35	Raices tipo A
A			
A	1.14542	24	Raices tipo B
570			

08:36 Sunday, April 29, 2001

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for N° hojas muertas

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha 0.05
 Error Degrees of Freedom 36
 Error Mean Square 0.039131
 Critical Value of t 2.02809
 Least Significant Difference 0.209
 Harmonic Mean of Cell Sizes 7.370079

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	tratamiento
A	1.2776	13	Con. Destapado
A			
B A	1.2197	4	Conrol Destapado
B A			
B A	1.1983	12	Sin. Destapado
B A			
B A	1.1118	13	Sin. tapado
B A			
B A	1.0963	4	Conrol tapado
B			
B	1.0304	13	Con. tapado

4. Análís del ensayo de aclimatación con raices tipo A con el programa estadístico SAS.

analisis ensayo de aclimatacion 135
 09:15 Sunday, April 15, 2001

----- ensayo=Raices buenas -----

The GLM Procedure

Dependent Variable: N° HOJAS MUERTAS

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	0.77661651	0.06471804	1.92	0.0888
Error	22	0.74090122	0.03367733		
Corrected Total	34	1.51751773			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	N° HOJAS MUERTAS Mean
0.511768	15.81618	0.183514	1.160292

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	7	0.24358521	0.03479789	1.03	0.4367
tratamiento	5	0.53303130	0.10660626	3.17	0.0266

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	7	0.24248371	0.03464053	1.03	0.4395
tratamiento	5	0.53303130	0.10660626	3.17	0.0266

analisis ensayo de aclimatacion 136

09:15 Sunday, April 15, 2001

----- ensayo=Raices buenas -----

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for N° HOJAS MUERTAS

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	0.033677
Critical Value of Studentized Range	4.72167
Minimum Significant Difference	0.4241
Harmonic Mean of Cell Sizes	4.173913

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	BLOQUE
A	1.3025	4	7
A			
A	1.2850	4	3
A			
A	1.1814	3	2
A			
A	.1709	6	1
A			
A	1.1432	4	6
A			
A	1.1015	6	4
A			
A	1.0779	4	8
A			
A	1.0492	4	5

analisis ensayo de aclimatacion 143
09:15 Sunday, April 15, 2001

----- ensayo=Raices tipo A-----

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for N° HOJAS MUERTAS

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	22
Error Mean Square	0.033677
Critical Value of Studentized Range	4.40547
Minimum Significant Difference	0.4066
Harmonic Mean of Cell Sizes	3.952941

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamiento
A	1.2952	8	Con. Destapado
A			
A	1.2586	7	Sin. Destapado
A			
A	1.2574	2	Conrol Destapado
A			
A	1.1294	8	Sin. tapado
A			
A	0.9926	8	Con. tapado
A			
A	0.9738	2	Conrol tapado

5. Análisis del ensayo de aclimatación con raíces tipo B con el programa estadístico SAS.

analisis ensayo de aclimatacion 154

09:15 Sunday, April 15, 2001

----- ensayo=Raices tipo B-----

The GLM Procedure

Dependent Variable: N° HOJAS MUERTAS

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	9	0.18496190	0.02055132	0.43	0.8966
Error	14	0.66780104	0.04770007		
Corrected Total	23	0.85276294			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	N° HOJAS MUERTAS Mean
0.216897	19.06754	0.218403	1.145420

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	4	0.09306214	0.02326553	0.49	0.7447
tratamiento	5	0.09189976	0.01837995	0.39	0.8507

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
BLOQUE	4	0.07853578	0.01963395	0.41	0.7974
tratamiento	5	0.09189976	0.01837995	0.39	0.8507

analisis ensayo de aclimatacion 155
 09:15 Sunday, April 15, 2001

----- ensayo=Raices tipo B-----

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for N° HOJAS MUERTAS

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	0.0477
Critical Value of Studentized Range	4.40661
Minimum Significant Difference	0.448
Harmonic Mean of Cell Sizes	4.615385

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	BLOQUE
A	1.2378	6	3
A			
A	1.1629	6	1
A			
A	1.1156	4	2
A			
A	1.0779	4	4
A			
A	1.0779	4	5

analisis ensayo de aclimatacion 156
 09:15 Sunday, April 15, 2001

----- ensayo=Raices tipo B-----

The GLM Procedure

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for N° HOJAS MUERTAS

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	14
Error Mean Square	0.0477
Critical Value of Studentized Range	4.63854
Minimum Significant Difference	0.5549
Harmonic Mean of Cell Sizes	3.333333

NOTE: Cell sizes are not equal.

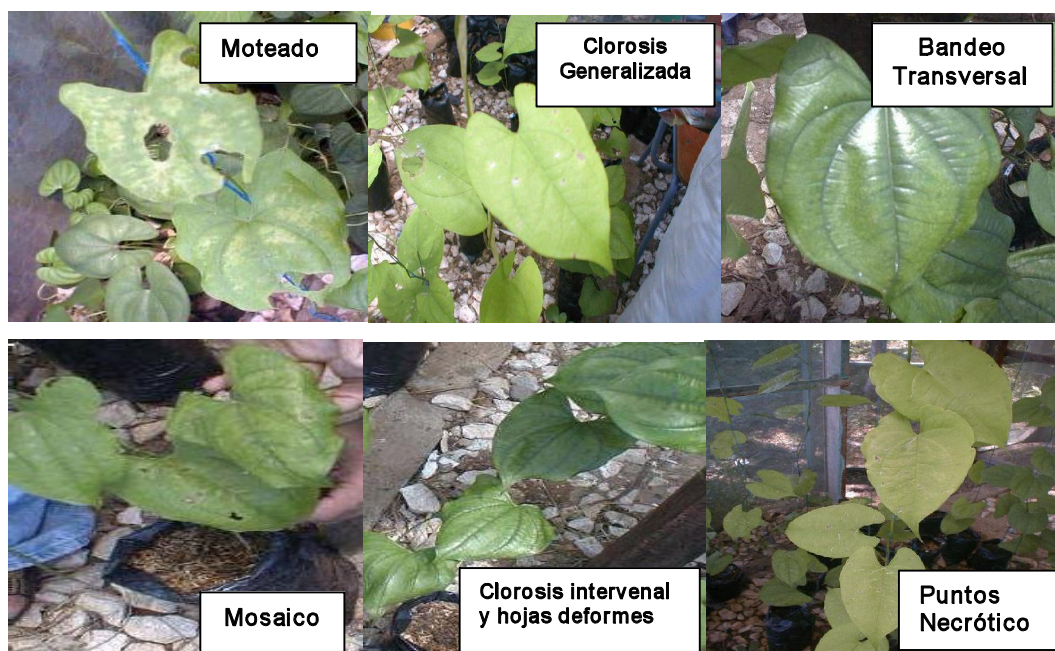
Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	tratamiento
A	1.2494	5	Con. Destapado
A			
A	1.2188	2	Conrol tapado
A			
A	1.1821	2	Conrol Destapado
A			
A	1.1138	5	Sin. Destapado
A			
A	1.0908	5	Con. tapado
A			
A	1.0837	5	Sin. Tapado

6. EVALUACIÓN DE LA SINTOMATOLOGÍA VIRAL DE *Dioscorea cayenensis* c.v “ñame amarillo” EN CONDICIONES DE CASA MALLA.

Resumen

Para el cultivo *in Vitro* de cualquier especie vegetal, el establecimiento en casa malla es crucial, ya que para garantizar el buen desarrollo morfológico y fisiológico de la planta madre se hace necesario aislarlas del medio externo, evitando así posibles daños mecánicos causados por hormigas arrieras, crisomélidos, ratas, coleópteros y la infestación de insectos transmisores de enfermedades. En nuestro país las enfermedades producidas por bacterias, nematodos, hongos y virus, son las principales responsables de importantes descensos en la producción y rendimiento de las superficies cultivadas con ñame, siendo estos dos últimos los que registran mayor incidencia. Para la evaluación de la sintomatología viral se hizo necesario el establecimiento en casa malla, el material biológico (tubérculos de ñame amarillo) se corto en secciones de aproximadamente 60g y se sembró en un sustrato compuesto por arena: tierra negra: material orgánico en proporciones 1:1:1 contenida en bolsas de polietileno y previamente esterilizado con formol, NaOCl y benlate®. Se llevaron a condiciones de casa malla con riego a intervalos de 7 días y malla protectora anti-áfidos. Entre la tercera y cuarta semana se obtuvo un 60.7 % de emergencia de brotes. A la octava semana las plantas alcanzaron una longitud total promedio de 147.77 cm con aproximadamente 17.27 segmentos nodales por planta. Al 83.88 % de las plantas se les detectó sintomatología viral mediante el método de observación visual. Tales síntomas corresponden a puntos necróticos, clorosis generalizada, clorosis intervenla, moteado, mosaico y deformación de hojas.



7. EFECTOS DE LA POSICION NODAL EN EL ESTABLECIMIENTO DE *IN VITRO* DE *Dioscorea cayenensis* c.v “ñame amarillo”.

Resumen

La propagación por segmentos nodales es uno de los métodos que permite regenerar un mayor número de plantas en corto tiempo, rompiendo la latencia de las yemas permitiendo así su elongación. Plantas madre de *D. cayenensis* se seccionaron en tres partes iguales: Superior (S), Media (M) e Inferior (I), observándose el desarrollo de cada una de las secciones en la fase de establecimiento *in vitro*. El material se inició en un medio básico MS modificado con 0.9 mg/L de BAP. De las plantas establecidas *in Vitro* no todas las secciones pasaron a la siguiente fase de multiplicación, por lo que se estima que la parte superior de la planta no presenta una buena respuesta en el establecimiento *in Vitro*, a diferencia de la parte inferior y media de la planta, que presentaron una buena respuesta, siendo esta última la que tubo mayor desarrollo ya que

mostró mayor número de sobrevivientes en la fase de multiplicación, lo que indica que para *D. cayenensis* es conveniente utilizar las secciones media e inferior de la planta madre para su establecimiento *in vitro*.

Grafico 7. Porcentaje de contaminación por sección de la planta madre, en el establecimiento *in vitro* de *D. cayenensis*.

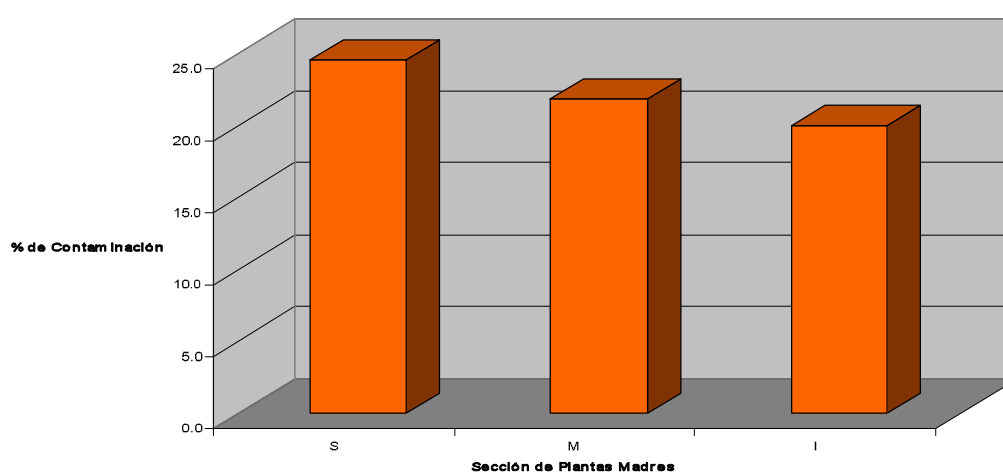


Grafico 8. Porcentaje de supervivencia por sección de la planta madre, en el establecimiento *in vitro* de *D. cayenensis*.

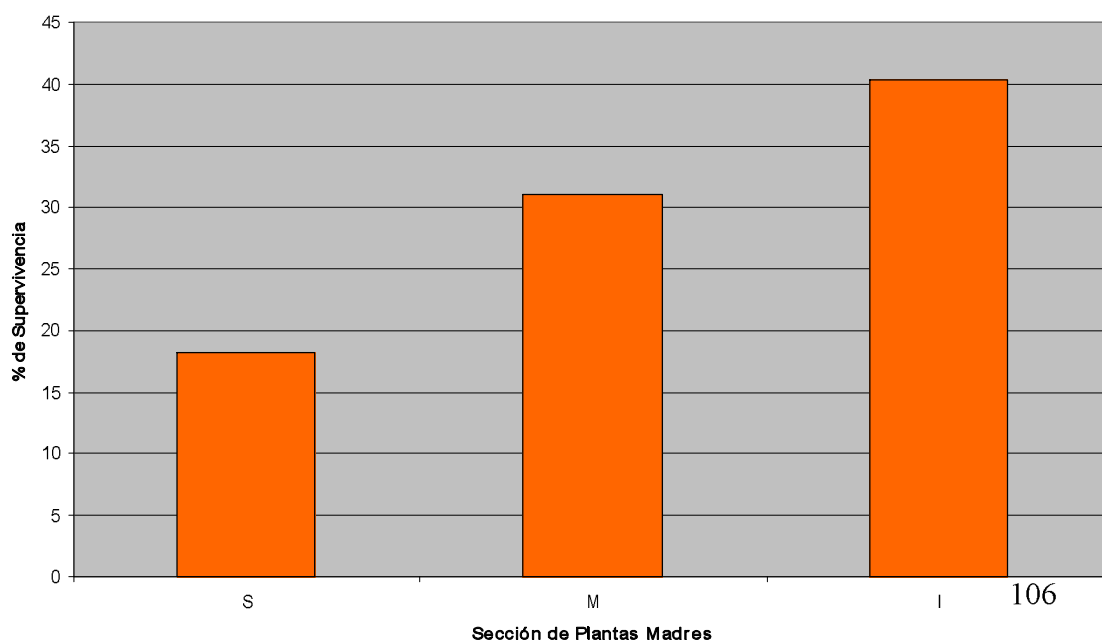


Grafico 9. Efecto de la ubicación de los explantes en la planta madre sobre el tiempo de formación de brotes *in Vitro* de *D. cayenensis*.

