

**CULTIVO IN VITRO DE ÑAME (*Dioscorea alata*) C.V. “ PICO
DE BOTELLA” A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES**

CARLOS ALBERTO RODRÍGUEZ JIMÉNEZ

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN
BIOTECNOLOGIA
SINCELEJO
2002**

CULTIVO IN VITRO DE ÑAME (*Dioscorea alata*) C.V. “ PICO DE BOTELLA” A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES.

CARLOS ALBERTO RODRÍGUEZ JIMÉNEZ

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

Director

**JAVIER DARIO BELTRÁN Ph. D.
Fitopatología**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGÍA ÉNFASIS EN BIOTECNOLOGIA
SINCELEJO
2002**

Nota de aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Sincelejo, marzo de 2002.

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado a todos los estudiantes de la Universidad de Sucre que en determinado momento compartieron mis ideas y me apoyaron en una lucha ideológica por promover el despertar y sentir universitario para gestionar una serie de cambios en pro del beneficio y la organización de la comunidad universitaria. También, a todos los estudiantes, docentes y trabajadores que hoy día mantienen y promueven ese espíritu de lucha y superación para con la universidad.

A un gran contradictor y polémico, que a pesar de todas las diferencias y confrontaciones en un batallar de ideas terminó siendo un gran amigo y compañero, que se retiró defendiendo su criterio y posición. "Hernando Gómez Franklin.

AGRADECIMIENTOS

El autor del presente trabajo expresa sus más sinceros agradecimientos a:

- Dios y a la vida por permitirme ser y creer.
- La Universidad de Sucre por haberme permitido confrontar la vida institucional con la social y por permitirme crecer intelectual y humanamente.
- Los docentes del programa de Biología con énfasis en Biotecnología de la Universidad de Sucre, quienes con sus enseñanzas y conocimientos se convirtieron en pilar fundamental de mi proceso de formación académica.
- El programa regional para la producción de semilla de ñame libre de patógenos utilizando algunas variedades de la Costa Atlántica, por su colaboración en el desarrollo del presente trabajo.
- Mis compañeros y amigos William, Robinson, Rafael, Fredy, Rocío, Diargis, Eduardo y Roberto por su apoyo, sugerencias y por haberme soportado todo este tiempo.
- Mis padres y familiares quienes siempre me apoyaron durante todo este proceso.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	16
1. OBJETIVOS	18
1.1 GENERAL.....	18
1.2 ESPECÍFICOS.....	18
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	19
3. MARCO TEÓRICO.....	20
3.1 ORIGEN DEL ÑAME	20
3.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ÑAME.....	20
3.3 MORFOLOGÍA DEL TUBÉRCULO	21
3.4 COMPOSICIÓN DE LOS TUBÉRCULOS DE ÑAME.....	21
3.5 ALTERNATIVAS DE UTILIZACIÓN DEL ÑAME.....	23
3.6 ENFERMEDADES DEL ÑAME.....	24
3.7 HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES	25
3.8 OBJETIVOS DEL CULTIVO DE TEJIDOS.....	29
3.9 USOS.....	29
3.10 VENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN.....	30
3.11 DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN.....	31
3.12 ETAPAS DE LA PROPAGACIÓN IN VITRO.....	31
3.13 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN.....	32
3.14 ESTRATEGIAS PARA LA PROPAGACIÓN CLONAL	33
4. METODOLOGIA.....	35
4.1 LOCALIZACIÓN	35
4.2 CONDICIONES AMBIENTALES	35
4.3 MEDIO DE CULTIVO.....	35
4.4 ESTABLECIMIENTO DE LAS PLANTAS MADRES	36
4.5 TIPO DE EXPLANTE	37
4.6 ETAPA DE DESINFECCIÓN	37
4.7 ETAPA DE INICIACIÓN	39
4.8 ETAPA DE MULTIPLICACIÓN	40

4.9 ETAPA DE ENRAIZAMIENTO	40
5. DISEÑO METODOLÓGICO	41
5.1 POBLACIÓN.....	41
5.2 NÚMERO DE REPETICIONES.....	41
5.3 UNIDAD DE ANÁLISIS	42
5.4 TRATAMIENTOS REALIZADOS EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA PROPAGACIÓN “IN VITRO” DE <i>D.ALA7A</i> C.V. PICO DE BOTELLA, PARA EVALUAR EL DESARROLLO DE LOS EXPLANTES.....	42
5.5 VARIABLES E INDICADORES	44
5.5.1 Etapa de desinfección.	44
5.5.2 Etapa de iniciación.	45
5.5.3 Etapa de multiplicación.	45
5.5.4 Etapa de enraizamiento.	45
6. RESULTADOS.....	46
6.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRES.....	46
6.2 ETAPA DE DESINFECCIÓN	46
6.3 ETAPA DE INICIACIÓN	47
6.3.1 Escisión de los explantes.	47
6.3.2 Influencia de la combinación ANA-BA sobre la formación de brotes en los explantes.	49
6.4 ETAPA DE MULTIPLICACIÓN	51
6.4.1 Influencia de la combinación ANA-BA en la multiplicación de brotes.	51
6.4.2 Ciclo de subcultivos.	54
6.5 ETAPA DE ENRAIZAMIENTO.....	55
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
7.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRES.....	57
7.2 DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES.....	57
7.3 ETAPA DE INICIACIÓN	58
7.3.1 Escisión de los explantes.	58
7.3.2 Influencia de la combinación ANA-BA sobre la formación de brotes en los explantes.	58
7.4 ETAPA DE MULTIPLICACIÓN	61
7.4.1 Influencia de la combinación ANA-BA en la multiplicación de los brotes.	61
7.4.2 Ciclo de subcultivos.	63
7.5 ETAPA DE ENRAIZAMIENTO.....	63
CONCLUSIONES	66

RECOMENDACIONES	68
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS.....	72

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1: Tratamientos realizados para la desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) de los explantes de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>).....	42
Cuadro 2: Tratamientos realizados en la etapa de iniciación para observar el efecto del ANA y el BA sobre la inducción de brotes en los explantes de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>).....	42
Cuadro 3: Tratamientos realizados en la etapa de multiplicación para observar el efecto del ANA y el BA en la inducción y desarrollo de segmentos nodales a partir de brotes de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>).....	43
Cuadro 4: Tratamientos realizados durante el ciclo de subcultivos, para observar el efecto del ANA y el BA en el desarrollo de los explantes (segmentos nodales) de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>).	43
Cuadro 5: Tratamientos realizados en la etapa de enraizamiento para observar el efecto de diferentes concentraciones de sales básicas del medio M.S. suplementadas con diferentes concentraciones de ANA sobre la inducción y desarrollo de raíces.....	44
Cuadro 6. Variables e indicadores de la etapa de desinfección.....	44
Cuadro 7. Variables e indicadores de etapa de iniciación.	45
Cuadro 8. Variables e indicadores de la etapa de multiplicación.....	45
Cuadro 9. Variable e indicadores de etapa de enraizamiento.....	45

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Morfología del tubérculo.....	22
Figura 2. Representación grafica de un corte transversal de un tubérculo de ñame mostrando las diferentes capas que lo conforman.....	23
Figura 3. Casa malla adecuada para el establecimiento de plantas madres de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>).....	37
Figura 4. Segmento nodal de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) utilizado como explante en el proceso de micropropagación.....	38
Figura 5. Estantería iluminada con luz fluorecente para la incubación de plantas <i>in vitro</i> de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>).....	39
Figura 6. Plantas madres de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) obtenidas después de dos meses de cultivo.....	46
Figura 7. Tipos de contaminación presentados en el cultivo <i>in vitro</i> de de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>). (A) Contaminación por bacterias. (B) contaminación por hongos.....	47
Figura 8. Porcentaje de explantes que no presentaron contaminación después de la aplicación de los distintos tratamientos con NaOCl (ver cuadro 1) en la etapa de desinfección.....	48
Figura 9. Porcentaje de explantes que no presentaron necrosis después de la aplicación de los diferentes tratamientos con NaOCl (ver cuadro 1) durante la fase de desinfección.....	48
Figura 10. Corte longitudinal realizado a un segmento nodal de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) para evaluar el desarrollo individual de las yemas.....	49

Figura 11.	Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 2) sobre la inducción de brotes en explantes de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) después de 20 días de incubación en la fase de iniciación.....	50
Figura 12.	Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 2) sobre la formación de brotes por explantes de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) después de 20 días de incubación en la fase de iniciación.....	50
Figura 13.	Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 2) sobre la inducción de brotes en explantes de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) después de 8 días de incubación durante la etapa de iniciación.....	51
Figura 14.	Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 3) sobre la inducción de nudos a partir de brotes en explantes de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) durante la etapa de multiplicación después de 20 días de incubación.....	52
Figura 15.	Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 3) sobre la altura alcanzada por las plantas de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) en la fase de multiplicación durante el período de incubación de 20 días.....	52
Figura 16.	Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 3) sobre el desarrollo de las hojas en plantas de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) durante un período de incubación de 20 días en la etapa de multiplicación.....	53
Figura 17.	Planta de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) mostrando un buen grado de vigorosidad después de 20 días de incubación en el tratamiento M11 (ANA 0.5 mg/L-BA 4.0 mg/L), durante la etapa de multiplicación.....	53
Figura 18.	Planta de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) obtenida en la etapa de multiplicación con el tratamiento M11 (ANA 0.5 mg/L-BA 4.0 mg/L) presentando un adecuado desarrollo del sistema radicular después de 20 días de incubación.....	54
Figura 19.	Influencia de la combinación hormonal ANA-BA sobre la obtención de plantas <i>in vitro</i> de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) después de 20 días de incubación durante la fase de subcultivos (ver cuadro 4).....	55

Figura 20.	Efecto de los diferentes tratamientos (ver cuadro 5) realizados durante la etapa de enraizamiento sobre la inducción de raíces en plántulas de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) durante un periodo de incubación de 30 días.....	56
Figura 21.	Efecto de los diferentes tratamientos (ver cuadro 5) realizados durante la etapa de enraizamiento sobre la longitud promedio de raíces en plántulas de ñame Pico de Botella <i>D. alata</i>) en un período de incubación de 30 días.....	56
Figura 22	Efectos del tratamiento I1(M.S.en ausencia de reguladores de crecimiento) sobre la inducción y desarrollo de brotes en explantes de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>).(A) Desarrollo de brotes de 1.0 cm. de altura después de 8 días de incubación. (B) Desarrollo de 1.0 nudo y varias hojas pasados 11 días de incubación.....	60
Figura 23.	Planta de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) obtenida durante la fase de subcultivo con el tratamiento S3 (ANA 0.5 mg/L-BA 4.0 mg/L) mostrando un buen desarrollo y la presencia de varios nudos.....	64
Figura 24.	Efecto de los tratamientos E4 (ANA 0,8 mg/L – sales M. S. al 100%), E2 (ANA 0,2 mg/L – sales M. S. al 100%) y M11 (ANA 0.5 mg/L – BA 4.0 g/L) sobre la inducción y la longitud promedio de raíces en plántulas de ñame Pico de Botella (<i>D. alata</i>) durante 20 días de incubación.....	65

Sólo el autor es responsable de las ideas expuestas en el presente trabajo.

Artículo 12, ley 23 del 2000.

RESUMEN

Segmentos nodales de ñame *D. alata* c.v. "Pico de Botella" fueron sembrados en el medio de cultivo de sales básicas de Murashige Skoog (Mantel 1972) suplementado con 0.1 mg/L de Tiamina, 100 mg/L de Mioinositol, 1 g/L de Carbón Activado, 0.8% de Agar-Agar, 30 g/L de sacarosa a un pH 5.8 y un foto período de 10 horas luz, para evaluar su comportamiento durante las diferentes etapas de la propagación *in vitro* a través de segmentos nodales; en la etapa de desinfección el tratamiento más eficiente resulto con la aplicación de etanol 70% por 1 minuto, peroxido de hidrógeno (H₂O₂) 2% por 2 minutos e hipoclorito de sodio (NaOCl) 2% por 10 minutos. En la fase de iniciación la inducción de brotes se vio favorecida por la ausencia de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo, obteniéndose un promedio de 2 brotes por explante en un periodo de 7 días. Sin embargo, durante la etapa de multiplicación los mejores resultados se obtuvieron con la adición al medio de cultivo de ANA (0.5 mg/L) y BA (4.0 mg/L), obteniéndose plantas bien desarrolladas con un promedio de 3.6 nudos por planta, una altura promedio de 4.43 cm, un promedio de 4.8 hojas por planta y además, permite obtener al mismo tiempo el desarrollo de raíces en forma eficiente con un promedio de 2.87 raíces por planta y una longitud promedio de 4.16 cm por raíz, durante un período de incubación de 20 días. Por otra parte la inducción de raíces en la fase de enraizamiento se ve favorecida por la adición al medio de cultivo de ANA (0.8 mg/L), aunque los resultados obtenidos no superan los obtenidos en la etapa de multiplicación.

SUMMARY

Nodal segments of yam *D. alata* c.v. “the neck of bottle” they were planted in the culture medium of basic safts Murashige y Skoog (Mantel, 1972) add 0.1 mg/L Thiamine, 100 mg/L Myoinositol, 1.0 gm/L Activated Charcoal, 0.8 % Agar-Agar, 30 gm/L Sucrosa, pH 5.8 photoperiod of ten hours ligh, to assess the conditions durant stage differents in the propagation in vitro through of nodal segments, in the disinfection stage the treatment most efficient was with the application of ethanol 70 % a one minute, hydrogen peroxide (H₂O₂) 2 % a two minutes, sodium hypochlorite (NaOCl) 2 % for ten minutes. At the iniciation the buds induction is favored by ausent of the grow regulator in the culture medium, obtaining an average two buds explant in a period at seven days. However, during multiplication stage the best result were obtained by adding to culture medium ANA (0.5 mg/L) and BA (4.0 mg/L), obtaining strong plants get a average 3.6 nodes a plant, average high 4.43 cm, average leave 4.8 a plant, besides, in the same time it get to grow of roots most efficient with a average of 2.87roots a plant and a average length of 4.16 cm a root during a period of incubation of twenty days. On the one hand the induction of roots in to talking roots phase is favoured by adding to culture medium of ANA (0.8 mg/L) although, the result get obtained do not reach the significative way the obtain the phase of multiplication.

INTRODUCCIÓN

La agricultura ocupa un renglón económico de gran importancia en el país y principalmente en la región Caribe, siendo uno de sus principales cultivos el ñame, el cuál por ser un producto regional es el de mayor interés en investigación por sus características particulares y por que su principal problema es la escasez de semilla sana para el cultivo.

Las plantas de ñame se ubican dentro del género Dioscórea y producen tubérculos comestibles, bulbos o rizomas que son de considerable importancia económica, además son monocotiledóneas pertenecientes a la familia Dioscoreáceas y al orden Dioscóreales (Ayensu, 1972). Esta familia cuenta con más de 600 especies existiendo aún muchas más silvestres, y cerca de 60 poseen tubérculos comestibles, de las cuales 10 están consideradas como cultivables; la especie más difundida es la *D alata* (Martín, 1976), cuyas variedades mejoradas están entre las mejores del mundo en cuanto a sabor, producción, características agronómicas y calidad de procesamiento.

Por otro lado, el área cultivada y principalmente productora de ñame comprende tres grandes regiones: África occidental, sur de Asia incluyendo parte de China y Japón, Oceanía y los países del Caribe (Ammirato, 1983) entre los cuales se encuentra Colombia específicamente la Costa Norte, donde el cultivo se ha visto afectado por

ciertas enfermedades causadas por organismos patógenos, lo que ha ocasionado una drástica disminución en el área cultivada y la producción (ver anexo 1). A lo anterior hay que sumarle la escasez de semilla de buena calidad, lo cual genera un mayor gasto para el productor, contribuyendo con el incremento de los costos de producción del cultivo y a su vez genera un efecto negativo en la economía regional campesina, y finalmente produce un gran impacto social.

El uso como semilla por parte de los productores de aproximadamente una tercera parte del total de la producción de tubérculos de ñame disminuye directamente la rentabilidad del cultivo; se considera además, que el uso de semilla de mala calidad (infestada por patógenos) es la causa más común de la presencia de enfermedades en los primeros estadios del desarrollo de las plantas de ñame. En tal sentido, la aplicación de la Biotecnología Vegetal, específicamente la regeneración de plantas *in vitro* a partir de segmentos nodales libres de patógenos, se presenta como una alternativa viable para resolver los problemas expuestos anteriormente en un tiempo relativamente corto.

1. OBJETIVOS

1.1 GENERAL

Implementar la técnica de propagación *in vitro* de plantas de ñame (*Dioscorea alata*, c.v. Pico de Botella) a través del cultivo de segmentos nodales para la multiplicación de semillas libres de patógenos sistémicos.

1.2 ESPECÍFICOS

- Determinar las condiciones óptimas para la desinfección de los explantes de ñame Pico de Botella.
- Evaluar efectos del ácido naftalenacético (ANA) y de 6-benciladenina (BA) en el desarrollo de los explantes.
- Probar diferentes concentraciones de sales minerales y de ácido naftalenacético (ANA) para la inducción y desarrollo de raíces en las vitroplantas.
- Confirmar que las anteriores condiciones de manejo permiten garantizar tasas de multiplicación óptimas para proveer al agricultor con semilla sana.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Hoy día el cultivo de ñame atraviesa por una aguda crisis que pone en peligro su futuro y el de aquellos que derivan de él su sustento, siendo el principal problema la falta de semilla de buena calidad (libre de patógenos sistémicos) para el cultivo, y la realización de estudios de producción (ver anexo 1). Por lo cual se hace necesario implementar la técnica biotecnológica de multiplicación de plantas *in vitro* a partir de segmentos nodales, debido a que esta técnica permite obtener semilla de ñame libre de patógenos, de alta calidad y a gran escala en un periodo de tiempo relativamente corto, en una forma muy eficiente y económica. Además, permite la disponibilidad de semilla en cualquier época del año y la creación de un banco de germoplasma para la conservación de la misma bajo condiciones controladas.

Por otra parte, hay que señalar que las plantas obtenidas por esta técnica (Multiplicación a partir de segmentos nodales) presentan una alta uniformidad fenotípica y ninguna variabilidad genética. También hay que destacar que esta es la técnica más natural que existe en el cultivo “*in vitro*” de tejidos vegetales y que requiere bajos niveles hormonales (Roca, 1991)

3. MARCO TEÓRICO

3.1 ORIGEN DEL ÑAME

Hoy día el origen del ñame no es totalmente claro, se considera que proviene del sur de Asia; aunque hay evidencias de que es oriundo de África, pero otras investigaciones consideran a las Antillas americanas como centro de origen; lo cierto es que determinadas especies tienen origen específico y variado, bastante disperso en las regiones tropicales del mundo; por ejemplo, algunas investigaciones revelan que *D. alata* L. se originó en Asia en Burna, Malasia, Indonesia, Filipinas y las islas del océano Pacífico durante la época precolombina (Acosta, 1980).

3.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ÑAME

Según Acosta (1980) el ñame se clasifica taxonómicamente así:

Reino: *Vegetal*

División: *Angiosperma*

Clase: *Monocotiledónea*

Orden: *Dioscoreales*

Familia: *Dioscoreáceas*

Genero: *Dioscórrea*

Especie: varias, entre las cuales encontramos: *alata*, *rotundata*, *cayenensis*, *triuda*, etc.

3.3 MORFOLOGÍA DEL TUBÉRCULO

El tubérculo es la estructura de interés económica en la planta de ñame, éste tiene forma y tamaño variable dependiendo de la especie y las condiciones del medio. En el tubérculo se distinguen tres partes: la cabeza, el centro y la cola, además presenta raíces adventicias y una estructura llamada “cormo” que es la que lo origina (figura 1). A nivel de tejidos en el tubérculo maduro se distinguen tres capas, inicialmente se encuentra la epidermis formada por células de corcho, luego se observa la corteza seguida por una capa de tejido meristemático localizada a pocos milímetros de la superficie y la cual permite el crecimiento del tubérculo (figura 2); Hacia el centro del tubérculo y seguido al tejido meristemático se encuentra el tejido vascular (Pérez, 1990).

3.4 COMPOSICIÓN DE LOS TUBÉRCULOS DE ÑAME

Al igual que en otros cultivos, la composición química de los tubérculos de ñame es variable; no solamente entre especies sino también en una misma especie en particular, dichas variaciones son debidas al clima y a los factores edáficos del medio en el cuál ha sido cultivado, además del método y el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, los tubérculos son una significativa fuente de vitamina C, hierro, calcio, ácido nicotínico y aproximadamente 8-10mg/100g de ácido ascórbico el cual es retenido en su mayoría durante la cocción (Ammirato, 1983). Además, en los tubérculos se presenta una gama de aminoácidos entre los cuales tenemos: asparagina, glutamina, arginina, leucina, serina, glicina y

valina; en bajas proporciones se encuentra también histamina y lisina (Asiedu, 1986) Ver anexo 2.

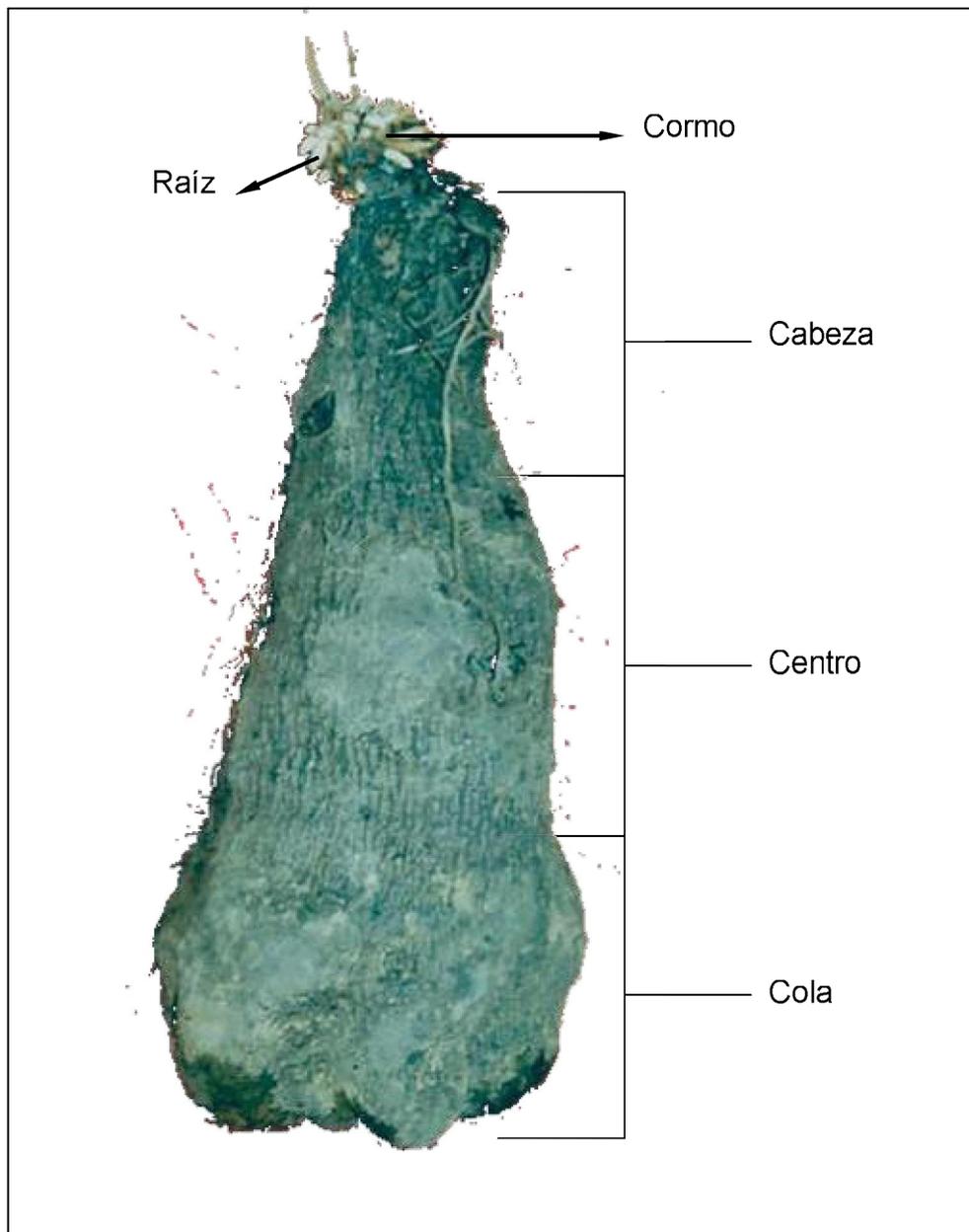


Figura 1. Morfología del tubérculo.

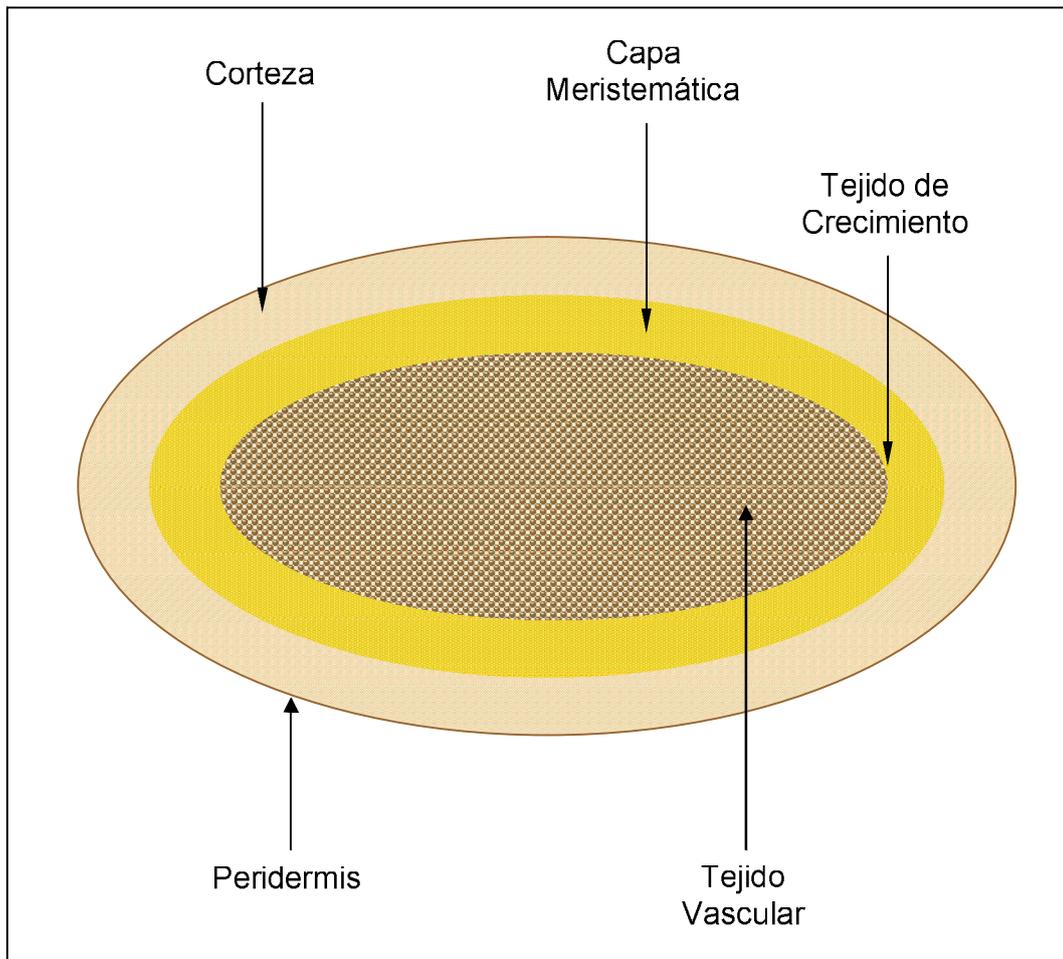


Figura 2. Representación grafica de un corte transversal de un tubérculo de ñame mostrando las diferentes capas que lo conforman.

3.5 ALTERNATIVAS DE UTILIZACIÓN DEL ÑAME

Actualmente el ñame tiene un amplio rango de aplicación o utilización, por ejemplo, en muchos estados norteamericanos es utilizado para preparar concentrados destinados a la alimentación de cerdos y otros animales; también es exportado a países europeos donde se emplea en la

elaboración de conservas, extracción de almidón y harina, la cual se utiliza en la preparación de embutidos (Ammirato, 1983).

Generalmente el ñame se consume hervido y sólo o como parte integral de las sopas, motes y dulces constituyendo así en África, la fuente básica de carbohidratos de la dieta humana (Ammirato, 1983). Además se utiliza en medicina tradicional como insecticida y algunas variedades tóxicas se emplean como veneno, otras son fuente de materia prima en la industria farmacéutica como fuente de diosgeninas usadas en la producción de anticonceptivos (Applezweig, 1997).

3.6 ENFERMEDADES DEL ÑAME

Las enfermedades del ñame son ocasionadas principalmente por virus, hongos, bacterias y nemátodos; patógenos que ponen en peligro la producción de ñame de alto rendimiento (Osorio y Ramírez, 1989).

Generalmente tres grupos de virus infectan al ñame: los potyvirus, dentro de los cuales se encuentra el virus del mosaico del ñame - YMV; los potexvirus, grupo donde se encuentra el virus latente del género *Dioscórrea* y el grupo de los cucumovirus, donde se ubica el virus del mosaico cucumber – CMV, (Brunt, 1989). La presencia de éstos en las plantas de ñame está asociada con síntomas foliares diferenciados (moteado y formación de bandas en las nervaduras y aclaración en las mismas) y con síntomas en los tubérculos denotados por la presencia de una mancha parda interna. Cabe anotar que todas las especies de ñame del Caribe colombiano pueden ser atacadas por virus puesto que por

tradición, el ñame se ha propagado vegetativamente y estos agentes patógenos se transmiten, año tras año, mediante partes vegetales a propagar (Osorio y Ramírez, 1989).

La principal enfermedad causada por nemátodos es la conocida “pudrición seca” ocasionada por el *Pratylenchus coffeae*. Los tubérculos afectados por ésta enfermedad tienen nemátodos vivos y por tanto, la siembra de este material solo sirve para diseminar la enfermedad. En la actualidad, el método más exitoso para evitar dicha diseminación es la propagación por medio de enredaderas, ya que estas no son afectadas por el *P. Coffeae*, y la propagación *in vitro* (Osorio y Ramírez, 1989).

Las enfermedades causadas por hongos y bacterias tienen particular importancia durante el almacenamiento de los tubérculos de ñame, los cuales son infectados por estos patógenos, generalmente, a través de tejidos lesionados o golpeados; después de la infección se presenta una pudrición extensiva de los tejidos centrales del tubérculo. Estas enfermedades pueden controlarse aplicando fungicidas o bactericidas según el caso y empleando material sano para la propagación. (Osorio y Ramírez, 1989).

3.7 HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

Desde hace 120 años aproximadamente, en las investigaciones de fisiología vegetal se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, órganos y células vegetales. Los primeros intentos en esta técnica fueron

realizados por Sacks y Knops, quienes observaron que los principales nutrientes de las plantas superiores eran las sustancias inorgánicas, y prepararon una solución nutritiva que las contenía, la cual ha sido utilizada por muchos investigadores desde entonces (Hurtado y Merino, 1994).

Posteriormente, Haberlandt realizó un intento de cultivo de células aisladas en tres géneros de monocotiledóneas: *Erihronium*, *Crnihcgalum* y *Trasdescantia*, sin obtener éxito. Al publicar su trabajo en 1902 declaró que los estudios posteriores deben encausarse hacia el estudio de la división de células aisladas, proporcionando información sobre las interrelaciones e influencias correlativas de las células e introduciendo el concepto de totipotencialidad celular (Hurtado y Merino, 1994).

Los progresos logrados en los años 30 siguientes a los experimentos de Haberlandt fueron muy pocos, pues varios investigadores reportaron trabajos desafortunados en el cultivo de células aisladas. Sin embargo, el trabajo pionero fue el de White en el año de 1934, con el cultivo de ápices de raíz de tomate (*Liccpersicum esculentum*) en medio líquido conteniendo sales inorgánicas, extracto de levadura y sacarosa, en donde obtuvo un crecimiento activo. Posteriormente demostró que el extracto de levadura podía ser sustituido por tiamina, piridoxina y niacina (Hurtado y Merino, 1994).

En 1936, Robbins estudió el efecto de los microelementos inorgánicos y señaló que el zinc, magnesio y boro son necesarios para el cultivo de

ápices radiculares. En 1937, White descubre la importancia de la vitamina B para el crecimiento de las raíces, importancia que comparte con la auxina AIA (ácido indolacético) descubierta en el mismo año por Went y Timan; en el mismo año, Gautheret estudia el efecto de los factores ambientales del desarrollo vegetal en sus medios de cultivo. Nobcourt hacia 1937, obtiene proliferación celular en el cultivo de raíces de zanahoria y es el primero en obtener callosidad con crecimiento limitado (Hurtado y Merino, 1994).

Morel y Martín son los primeros investigadores que logran obtener plantas libres de virus en dalia a partir de meristemos apicales de tallo. Muir, Hiderbrandt y Riker (1954) transfieren segmentos de callo en medio líquido en agitación y tienen éxito al obtener cultivos en suspensión conteniendo células aisladas y pequeñas agrupaciones celulares (Hurtado y Merino, 1994).

En 1955, Skoog identifica la 6-furfurilaminopurina (cinetina) observando la habilidad de este regulador del crecimiento vegetal para iniciar la división celular. En 1957, Skoog y Miller, usando combinaciones de auxina y cinetina, controlaron más detalladamente la formación de brotes y raíces en el cultivo de callos de tabaco (Hurtado y Merino, 1994).

En el año de 1962, Murashige y Skoog desarrollaron un medio nutritivo con el que lograron un crecimiento rápido en tejidos de tabaco, en la actualidad, las sales inorgánicas de este medio son utilizadas con mucho

éxito en casi todas las especies vegetales. En 1963 es organizado el primer Congreso Internacional de Cultivo de Tejidos de la Universidad de Pensylvania, Estados Unidos por White. Más tarde Guha y Maheshwari obtienen las primeras plantas haploides en el cultivo de anteras de *Datura innoxia* (Hurtado y Merino, 1994).

Durante la década de los 70 se realizó un gran número de investigaciones enfocadas a estudios de embriogénesis, organogénesis, hibridación, diferenciación, fitopatología, citología mutagénesis y producción de metabolitos secundarios (Hurtado y Merino, 1994) A partir de esta década se han desarrollado un sinnúmero de trabajos en plantas ornamentales, agrícolas y forestales, todos orientados al desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas de cultivo *in vitro* para ser utilizadas en la solución de determinados problemas en dichas plantas.

Entre los trabajos más importantes orientados a la obtención de semilla libre de patógenos en el campo de la agricultura tenemos el realizado por Mantell S. H. en 1980 donde plantea la utilización del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) para la micropropagación de ñame, suplementado con 6-bencilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) y agar; utilizando etanol seguido de hipoclorito de sodio en el proceso de desinfección. En 1983, Cortés, Amelia y Jung Lee obtienen una rápida propagación de *D. alata* y *D. roundata* utilizando segmentos nodales y el medio de cultivo MS suplementado con kinetina, ácido indolacético (AIA), ANA y agar a un pH de 5.8. Una década más tarde, en 1993, Wolfgang y Hyeon. emplea el medio MS suplementado con

ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones que varían de 1 a 10 μM en la inducción de *D. bulbifera*. En 1996, Mantell y Twyford producen embriones somáticos de *D. alata* utilizando el medio MS suplementado con 2,4-D y sacarosa a una temperatura de 25°C obteniendo un 80% de supervivencia. En este mismo año, Villordon, estudio la variación genética en *Hipomea batata* L. propagada por segmentos nodales y brotes adventicios. Y en 1998 Perea M. et al. Estudiaron el aumento en la proliferación de brotes a partir de segmentos nodales en *D. alata* mediante el empleo de thiadiosuron y BAP.

3.8 OBJETIVOS DEL CULTIVO DE TEJIDOS

Los objetivos perseguidos con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales son numerosos y diferentes. Brevemente, las posibilidades de aplicación de tales cultivos se pueden resumir así: a) estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; b) bioconversión y producción de compuestos útiles; c) incremento de la variabilidad genética; d) obtención de plantas libres de patógenos; e) propagación de plantas; f) conservación e intercambio de germoplasma (Roca, 1991).

3.9 USOS

Según Hartmann, en propagación, los sistemas de cultivo de tejidos tienen dos usos principales: 1) la propagación rápida en masa de clones y 2) el desarrollo, mantenimiento y distribución de clones específicos probados para organismos patógenos secundariamente, estos sistemas tienen potencial para hacer embarques de material de propagación a

distancias grandes y el almacenamiento a largo plazo del material clonado. Además, paralelo a estos usos, dichos sistemas tienen potencial para la producción de varios productos secundarios tales como sustancias farmacéuticas en suspensiones celulares (Hartmann y Kester, 1987).

3.10 VENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

Antes de hablar de las ventajas se hace necesario definir el concepto de micropropagación, por lo cual si el cultivo de tejidos consiste en cultivar asépticamente diferentes explantes constituidos por fracciones de un tejido u órgano que se extrae de la planta, la micropropagación es prácticamente una multiplicación masiva *in vitro* que presenta las siguientes ventajas según Roca (1991):

- a) Incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo.
- b) Reducción del tiempo de multiplicación.
- c) Posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida, a bajos costos en tiempos económicamente costeados.
- d) Mayor control sobre la sanidad del material que se propaga.
- e) Facilidad para transportar material *in vitro* de un país a otro, con menos restricciones aduaneras,

- f) Posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual sólo existan pocos individuos.

3.11 DESVENTAJAS DE LA MICROPROPAGACIÓN

La micropropagación también presenta sus problemas, por ejemplo: Las instalaciones necesarias son costosas y en muchas especies de plantas las consideraciones económicas son tales que no justifiquen su empleo comercial. Para efectuar las operaciones se necesita adiestramiento específico. Los errores en identidad, introducción de organismos patógenos desconocidos o la aparición de un mutante desapercibido puede multiplicarse a una escala considerable en un tiempo muy corto (Hartmann y Kester, 1987).

3.12 ETAPAS DE LA PROPAGACIÓN IN VITRO

Murashige y otros encontraron que era útil destacar la secuencia de eventos asociados con la multiplicación de plantas mediante las técnicas de cultivo aséptico de la siguiente manera:

ETAPA I. Es la etapa de iniciación o de establecimiento en la cual se
Establece el cultivo inicial o primario.

ETAPA II. Es la etapa de multiplicación de brotes o multiplicación simple.

ETAPA III. Corresponde al enraizamiento o etapa de pretransplante; tiene como objetivo producir una planta autotrófica que pueda sobrevivir en condiciones del transplante de suelo.

Además de estas 3 etapas propuestas inicialmente por Murashige 1974, Roca (1991) considera otras dos como parte integral del procedimiento:

ETAPA 0. selección de una modalidad de pretratamiento para volver funcional la estrategia que se adopte.

ETAPA IV. Transferencia final a la etapa de medio ambiente.

3.13 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA MICROPROPAGACIÓN

Existen diferentes factores que determinan el éxito de los sistemas de micropropagación; según Roca (1991) los más importantes son:

- Planta que dona el explante: el estado fisiológico de la planta madre influye significativamente en la capacidad morfogénica del explante, de igual forma que la edad fisiológica del mismo.
- El explante: para el buen desarrollo del mismo, deben seleccionarse explantes saludables, de tejido meristemático u órganos no muy especializados; además no se deben utilizar explantes ni muy viejos ni muy jóvenes.
- Factores físicos: la luz y la temperatura han sido los factores físicos más estudiados; la temperatura de incubación para la propagación de plantas depende de la especie, aunque en la mayoría de las familias la temperatura fluctúa entre 24 y 28°C. La luz es un factor fundamental

en la morfogénesis y su papel en la diferenciación involucra varios componentes como son la intensidad, el fotoperiodo y la calidad.

- El medio de cultivo: el éxito en el cultivo de tejidos depende de la selección del medio de cultivo, incluyendo su composición química y su forma física.

3.14 ESTRATEGIAS PARA LA PROPAGACIÓN CLONAL

Existen varias vías generales para realizar la multiplicación clonal; entre éstas están: la multiplicación de brotes de yemas terminales, axilares o laterales; la organogénesis directa; la organogénesis indirecta; la embriogénesis somática; los órganos de perennidad, formados en cultivos asépticos; el microinjerto y el cultivo de embriones y esporas (Roca, 1991).

Hartmann y Kester, en su libro “Propagación de Plantas” (1987), plantean la siguiente clasificación general de los sistemas de micropropagación y de cultivo de tejidos utilizando sistemas asépticos de cultivo *in vitro*:

Clase I: Regeneración de nuevas plantas a partir de estructuras vegetativas o tejidos.

1. Cultivo de puntas meristemáticas.
2. Microinjerto.

3. Cultivo de puntas de tallo.
4. Cultivo de ramas o tallos adventicios.
5. Cultivo de tejidos y células:
 - Cultivo de callo
 - Suspensiones de células
 - Cultivo de protoplastos.

Clase II: Reproducción de plántulas por escisión de estructuras reproductivas existentes.

1. Cultivo de anteras y polen.
2. Cultivo de óvulos.
3. Cultivo de embriones.
4. Cultivo de semillas.
5. Cultivo de esporas.

4. METODOLOGIA

4.1 LOCALIZACIÓN

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, la cual se encuentra localizada a 9° 9' de latitud norte y a 75° 27' de longitud oeste del meridiano de Greenwich; presentando una humedad relativa del 77%, una precipitación anual de 1087.5mm, altitud de 200 m.s.n.m. y una temperatura promedio de 28°C.

4.2 CONDICIONES AMBIENTALES

Las condiciones ambientales en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales son:

- Temperatura: 27°C ± 2
- Humedad relativa: 50% ±5
- Intensidad lumínica: 1000 – 1500 lux.
- Fotoperíodo: 10 horas luz

4.3 MEDIO DE CULTIVO

Para el desarrollo de este trabajo, se utilizó el medio de sales básicas propuesto por Murashige y Skoog, 1962 (anexo 3) suplido con tiamina-

HCl (1,0 mg/l); mioinositol (100 mg/l), sacarosa (30 g/l) y agar (8 g/l). En todas las etapas se utilizó un volumen de 20 ml de medio de cultivo por frasco.

4.4 ESTABLECIMIENTO DE LAS PLANTAS MADRES

Las semillas de *Dioscórrea alata*, c.v. Pico de Botella que se utilizaron en el establecimiento de las plantas madres fueron obtenidas del banco de germoplasma de la Universidad Córdoba (Montería, Colombia). Estas semillas se hicieron germinar mediante la técnica tradicional de cultivo, sembrando fragmentos de tubérculo en sustrato estéril (15 lb de presión, 121°C por 20 minutos), el cual estaba compuesto por una mezcla de tierra fértil, cascarilla de arroz y arena en proporciones 3:2:1 respectivamente, renovado cada tres meses con el fin de asegurar el buen desarrollo morfológico y fisiológico de las plantas madres; las cuales fueron mantenidas en una casa malla a prueba de áfidos con piso de concreto. (figura 3).

Por otro lado, el riego de las plantas donadoras de explantes se realizó de forma manual, adicionando el agua en la base del tallo de las mismas, en una sola sesión diaria a las 7:00 a.m.; Al mismo tiempo, se vigiló el comportamiento de dichas plantas y se le realizaron podas sistemáticas eliminando hojas secas y en mal estado o afectadas por el ataque de hormigas, plagas, etc. Además se realizó control sanitario cada vez que fue necesario tanto en el interior como en el exterior de la casa malla.



Figura 3. Casa malla adecuada para el establecimiento de plantas madres de ñame Pico de Botella (*D. alata*)

4.5 TIPO DE EXPLANTE

Como explantes se utilizaron segmentos nodales, de plantas madres de 2 a 3 meses de edad, que presentaban yemas laterales y los cuales tenían una longitud aproximada de 1.0 cm.(figura 4).

4.6 ETAPA DE DESINFECCIÓN

Una vez obtenidos los explantes se les realizó un lavado inicial con una solución de detergente (10 g/L) por 10 minutos, luego se les realizaron 5



Figura 4. Segmento nodal de ñame Pico de Botella (*D.alata*) utilizado como explante en el proceso de micropropagación.

lavados con suficiente agua para retirar restos de detergente. Posteriormente fueron llevados a la cámara de flujo laminar donde se sumergieron en etanol (70%) por 1 minuto seguido de tres lavados con agua destilada estéril; luego se sumergieron en peróxido de hidrógeno (2%) por 2 minutos seguido de tres lavados con agua destilada estéril y finalmente se les hizo una desinfección con hipoclorito de sodio en concentraciones de 1.0, 2.0 y 3.0 % (v/v) por tres diferentes periodos de tiempo (10, 15 y 20 minutos) para cada una de las concentraciones, para un total de 9 tratamientos (ver cuadro 1). Finalmente los explantes fueron sembrados en medio M.S. sin reguladores de crecimiento y almacenados

en un cuarto de crecimiento por 20 días periodo en el cual se realizó la toma de datos (figura 5).



Figura 5. Estantería iluminada con luz fluorescente para la incubación de plantas *in vitro* de ñame Pico de Botella (*D. alata*).

4.7 ETAPA DE INICIACIÓN

En esta etapa los explantes fueron sembrados en medio M.S. suplementado con ANA en concentraciones de 0.0, 0.1 y 0.3 mg/L y/o con BA en concentraciones de 0.0, 0.2, 0.5, 0.7 y 1.0 mg/L., para un total de 15 tratamientos (ver cuadro 2), posteriormente se almacenaron en un cuarto de crecimiento por un periodo de 20 días, tiempo en el cual se realizó la toma de datos.

4.8 ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

En esta fase, los explantes fueron sembrados en medio M.S. suplementado con 5 concentraciones de ANA (0.0, 0.3, 0.5, 0.7 y 1.0 mg/L) y 4 concentraciones de BA (0.0, 2.0, 4.0 y 8.0 mg/L) para un total de 20 tratamientos (ver cuadro 3), posteriormente fueron almacenados en un cuarto de crecimiento por un periodo de 30 días, tiempo en el cual se realizaron las observaciones y mediciones respectivas.

4.9 ETAPA DE ENRAIZAMIENTO

En esta etapa, las plantas fueron sembradas en 4 concentraciones de sales básicas del medio de cultivo M.S. (25, 50, 75 y 100 %), suplementadas cada una con 6 concentraciones de ANA (0.0, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.6 mg/L), para un total de 20 tratamientos (ver cuadro 5); los cuales fueron incubados en un cuarto de crecimiento por 30 días, periodo durante el cual se realizó la toma de datos.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

El presente trabajo fue realizado utilizando un diseño experimental de bloques totalmente al azar en todas las etapas (Cochran, 1990) y el análisis de los datos se realizó un análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo, y la prueba de rango de Duncan, empleando el programa estadístico NCSS.

5.1 POBLACIÓN

La población objeto de estudio en este trabajo fue de 640 explantes, distribuidos de la siguiente forma:

- Etapa de desinfección : 90 explantes
- Etapa de iniciación :150 explantes
- Etapa de multiplicación : 200 explantes
- Etapa de enraizamiento : 200 explantes

5.2 NÚMERO DE REPETICIONES

En el presente trabajo se emplearon un total de 10 repeticiones por tratamiento para cada una de las etapas.

5.3 UNIDAD DE ANÁLISIS

Como unidad de análisis se emplearon 10 explantes por tratamiento.

5.4 TRATAMIENTOS REALIZADOS EN LAS DIFERENTES ETAPAS DE LA PROPAGACIÓN “IN VITRO” DE *D. ALATA* C.V. PICO DE BOTELLA, PARA EVALUAR EL DESARROLLO DE LOS EXPLANTES.

Cuadro 1: Tratamientos realizados para la desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) de los explantes de ñame Pico de Botella (*D. alata*).

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE NaOCl (%)	TIEMPO DE INMERSIÓN (min.)
D1	1.0	10
D2	1.0	15
D3	1.0	20
D4	2.0	10
D5	2.0	15
D6	2.0	20
D7	3.0	10
D8	3.0	15
D9	3.0	20

Cuadro 2: Tratamientos realizados en la etapa de iniciación para observar el efecto del ANA y el BA sobre la inducción de brotes en los explantes de ñame Pico de Botella (*D. alata*).

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE ANA (mg/L)	CONCENTRACIÓN DE BA (mg/L)
I1	0.0	0.0
I2	0.0	0.2
I3	0.0	0.5
I4	0.0	0.7
I5	0.0	1.0
I6	0.1	0.0
I7	0.1	0.2
I8	0.1	0.5
I9	0.1	0.7
I10	0.1	1.0
I11	0.3	0.0
I12	0.3	0.2
I13	0.3	0.5
I14	0.3	0.7
I15	0.3	1.0

Cuadro 3: Tratamientos realizados en la etapa de multiplicación para observar el efecto del ANA y el BA en la inducción y desarrollo de segmentos nodales a partir de brotes de ñame Pico de Botella (*D. alata*).

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE ANA (mg/L)	CONCENTRACIÓN DE BA(mg/L)
M1	0.0	0.0
M2	0.0	2.0
M3	0.0	4.0
M4	0.0	8.0
M5	0.3	0.0
M6	0.3	2.0
M7	0.3	4.0
M8	0.3	8.0
M9	0.5	0.0
M10	0.5	2.0
M11	0.5	4.0
M12	0.5	8.0
M13	0.7	0.0
M14	0.7	2.0
M15	0.7	4.0
M16	0.7	8.0
M17	1.0	0.0
M18	1.0	2.0
M19	1.0	4.0
M20	1.0	8.0

Cuadro 4: Tratamientos realizados durante el ciclo de subcultivos, para observar el efecto del ANA y el BA en el desarrollo de los explantes (segmentos nodales) de ñame Pico de Botella (*D. alata*).

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE ANA (mg/L)	CONCENTRACIÓN DE BA(mg/L)
S1	0.5	3.0
S2	0.5	3.5
S3	0.5	4.0
S4	0.5	4.5
S5	0.5	5.0

Cuadro 5: Tratamientos realizados en la etapa de enraizamiento para observar el efecto de diferentes concentraciones de sales básicas del medio M.S. suplementadas con diferentes concentraciones de ANA sobre la inducción y desarrollo de raíces.

TRATAMIENTOS	CONCENTRACIÓN DE SALES M.S. (%)	CONCENTRACIÓN DE ANA(mg/L)
E1	100	0.0
E2	100	0.2
E3	100	0.4
E4	100	0.8
E5	100	1.6
E6	75	0.0
E7	75	0.2
E8	75	0.4
E9	75	0.8
E10	75	1.6
E11	50	0.0
E12	50	0.2
E13	50	0.4
E14	50	0.8
E15	50	1.6
E16	25	0.0
E17	25	0.2
E18	25	0.4
E19	25	0.8
E20	25	1.6

5.5 VARIABLES E INDICADORES

5.5.1 Etapa de desinfección.

Cuadro 6. Variables e indicadores de la etapa de desinfección.

Variables	Indicadores
Concentración de NaOCl (%)	Número de explantes contaminados por hongos.
	Número de explantes contaminados por bacterias.
Tiempo (minutos) de inmersión de los explantes en NaOCl	Número de explantes contaminados por levaduras.
	Número de explantes necróticos.

5.5.2 Etapa de iniciación.

Cuadro 7. Variables e indicadores de etapa de iniciación.

Variables	Indicadores
Concentración de BA (mg/L).	Número de explantes con brotes.
Concentración de ANA (mg/L).	Número de brotes por explantes.

5.5.3 Etapa de multiplicación.

Cuadro 8. Variables e indicadores de la etapa de multiplicación.

Variables	Indicadores
Concentración de BA (mg/L).	Número de nudos por plántulas.
Concentración ANA (mg/L).	Altura de la plántula (cm).
	Número de hojas por plántulas (cm).

5.5.4 Etapa de enraizamiento.

Cuadro 9. Variable e indicadores de etapa de enraizamiento.

Variable	Indicadores
Concentración de ANA. (mg/L).	Número de raíces por plantas.
Concentración de sales básicas del medio de cultivo M.S. (%).	Longitud promedio de las raíces (cm).

6. RESULTADOS

6.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRES

Pasados 25 días después de la siembra de las piezas de tubérculo, estos comenzaron a germinar y a los 60 días las plantas madres habían alcanzado una altura superior a 2.0 m, el porcentaje de germinación obtenido fue de 95% (figura 6).



Figura 6. Plantas madres de ñame Pico de Botella (*D. alata*) obtenidas después de dos meses de cultivo.

6.2 ETAPA DE DESINFECCIÓN

En el desarrollo de esta etapa se observó la presencia de colonias de hongos y/o bacterias (Figura 7) en los tratamientos D1, D2, D4, D5 y D7.

Los resultados del proceso de desinfección se ilustran en la figura 8, donde se observa que los tratamientos D3, D6, D8 y D9 son los que presentan el grado de desinfección más alto, con un 100% de explantes no contaminados para cada uno, más sin embargo, los tratamientos D6, D7, D8 y D9 presentaron los niveles de necrosis más altos, con un 90, 100, 100 y 100% respectivamente (Figura 9), mientras que el tratamiento D3 presentó necrosis en pequeñas zonas de los explantes, pero aún así se obtuvo un buen desarrollo de los mismos.

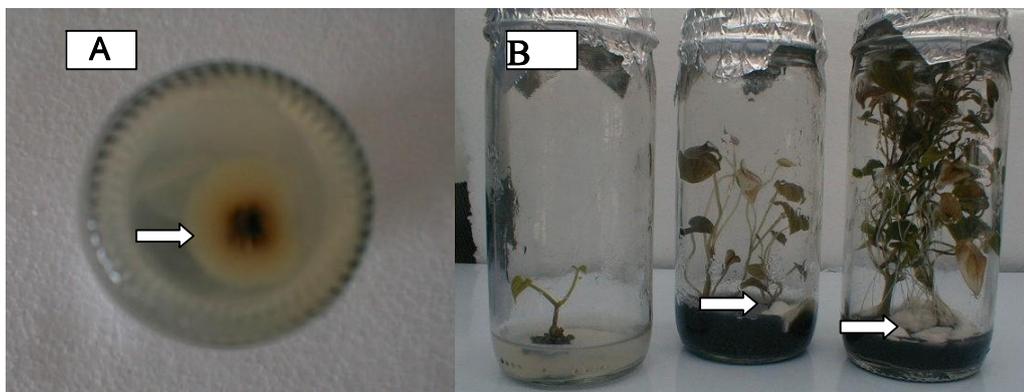


Figura 7. Tipos de contaminación presentados en el cultivo *in vitro* de de ñame Pico de Botella (*D. alata*). (A) Contaminación por bacterias. (B) contaminación por hongos.

6.3 ETAPA DE INICIACIÓN

6.3.1 Escisión de los explantes. En esta fase del establecimiento del cultivo se observó que a diferencia de los explantes enteros, que cuando se separaron las yemas haciendo un corte longitudinal del explante (Figura 10), no hubo germinación de las mismas y se presentaba descomposición total del material vegetal en los explantes, pasados 7 días después del corte.

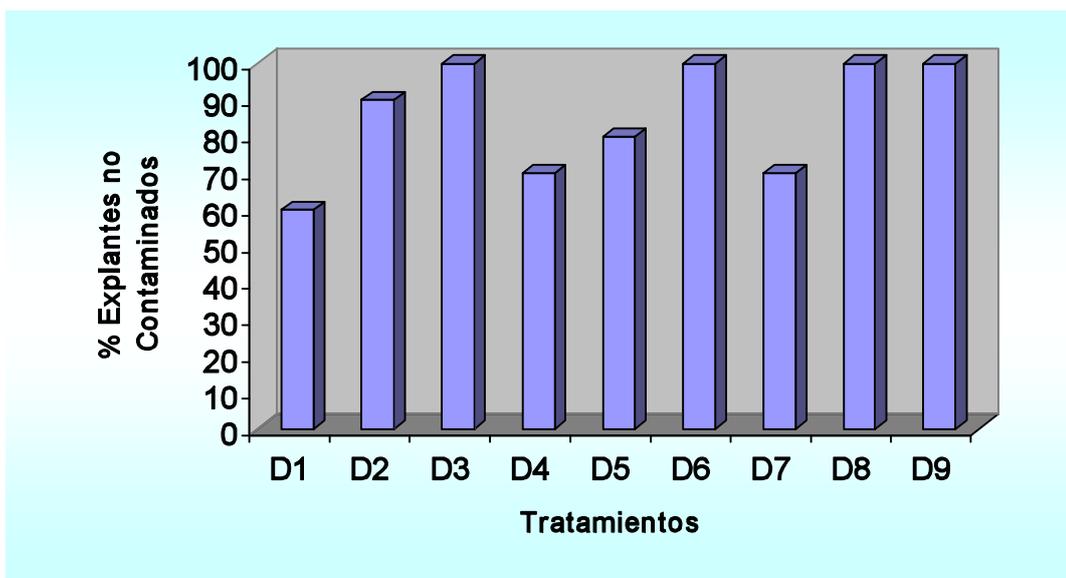


Figura 8. Porcentaje de explantes que no presentaron contaminación después de la aplicación de los distintos tratamientos con NaOCl (ver cuadro 1) en la etapa de desinfección.

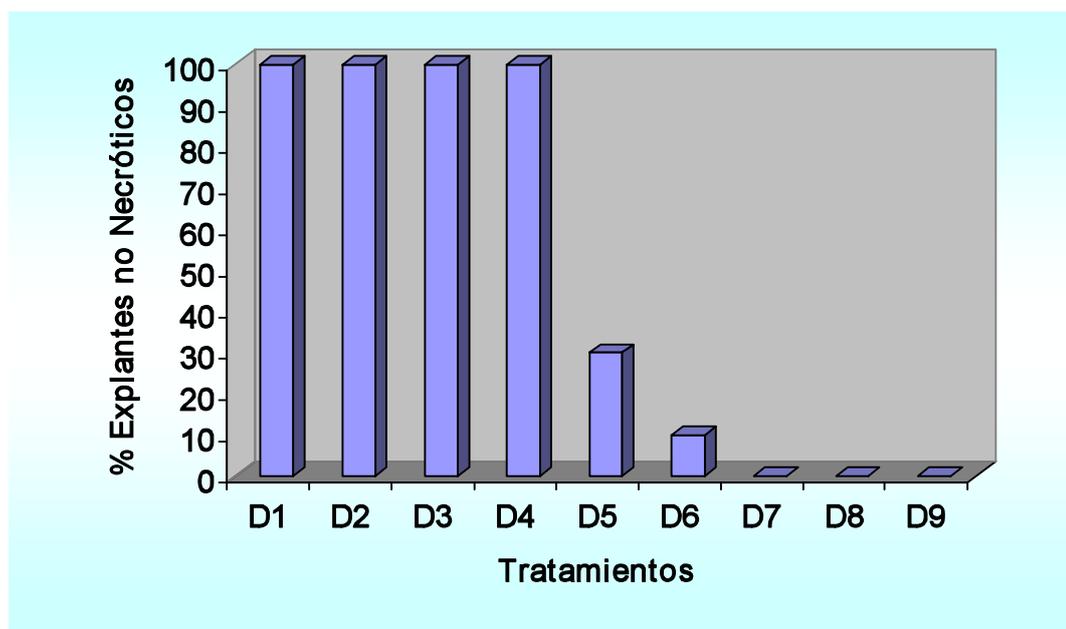


Figura 9. Porcentaje de explantes que no presentaron necrosis después de la aplicación de los diferentes tratamientos con NaOCl (ver cuadro 1) durante la fase de desinfección.



Figura 10. Corte longitudinal realizado a un segmento nodal de ñame Pico de Botella (*D. alata*) para evaluar el desarrollo individual de las yemas.

6.3.2 Influencia de la combinación ANA-BA sobre la formación de brotes en los explantes. En el desarrollo de esta fase se observó que en la mayoría de los tratamientos diseñados, el porcentaje de explantes que presentaron formación de brotes fue igual o superior al 50% (Figura 11), siendo los tratamientos I1, I2, I4, I5 e I12, los que presentaron los niveles de brotación más altos, con un 100% de brotación cada uno, mientras los mejores resultados en cuanto a número de brotes por explante se obtuvo en los tratamientos I5, I4, I3, I2 e I1 con 2.8, 2.5, 2.2, 2.2 y 2.0 brotes por explante respectivamente (Figura 12). Por otro lado, se observó que los explantes sembrados en los tratamientos I1, I2, I3 e I4 habían alcanzado un 90% de brotación tras 7 días de incubación (Figura 13), siendo los explantes sembrados en los tratamientos I1 e I2 los primeros en responder alcanzando así un mejor desarrollo que los de I3 e I4.

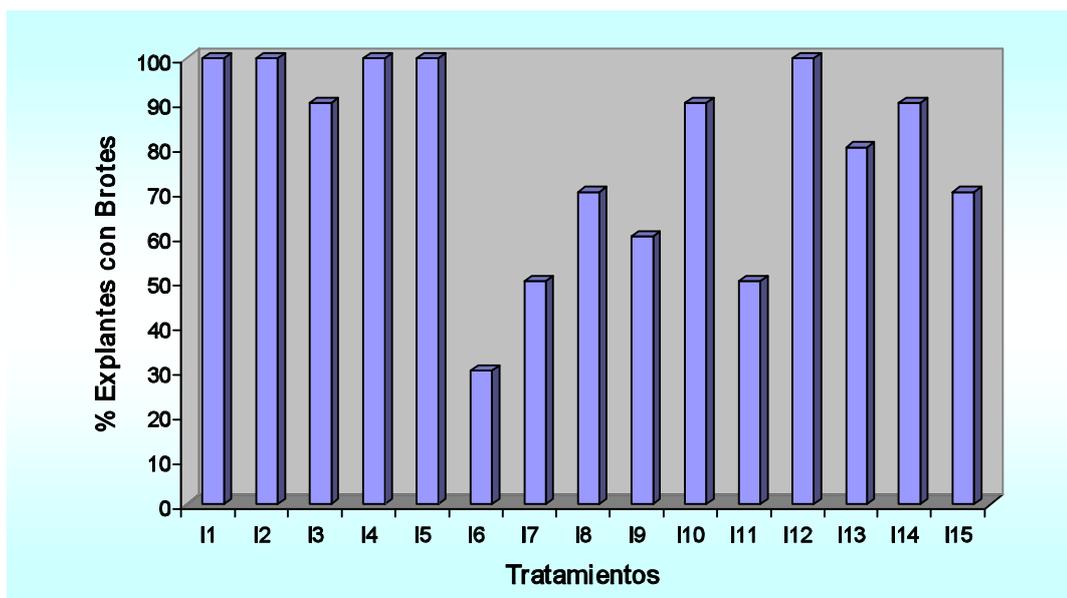


Figura 11. Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 2) sobre la inducción de brotes en explantes de ñame Pico de Botella (*D. alata*) después de 20 días de incubación en la fase de iniciación.

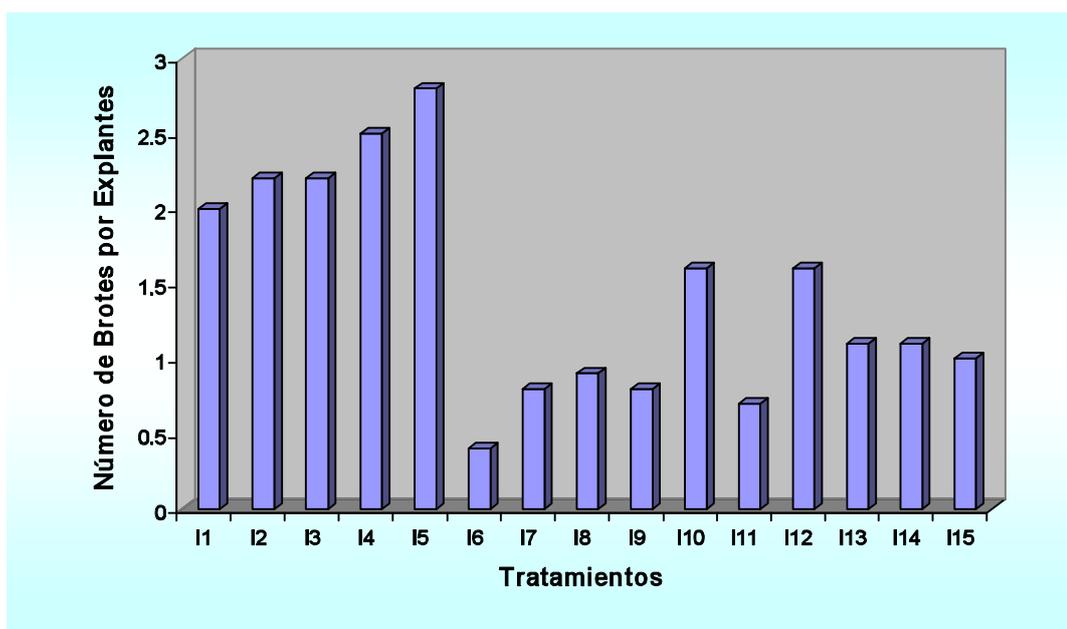


Figura 12. Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 2) sobre la formación de brotes por explantes de ñame Pico de Botella (*D. alata*) después de 20 días de incubación en la fase de iniciación.

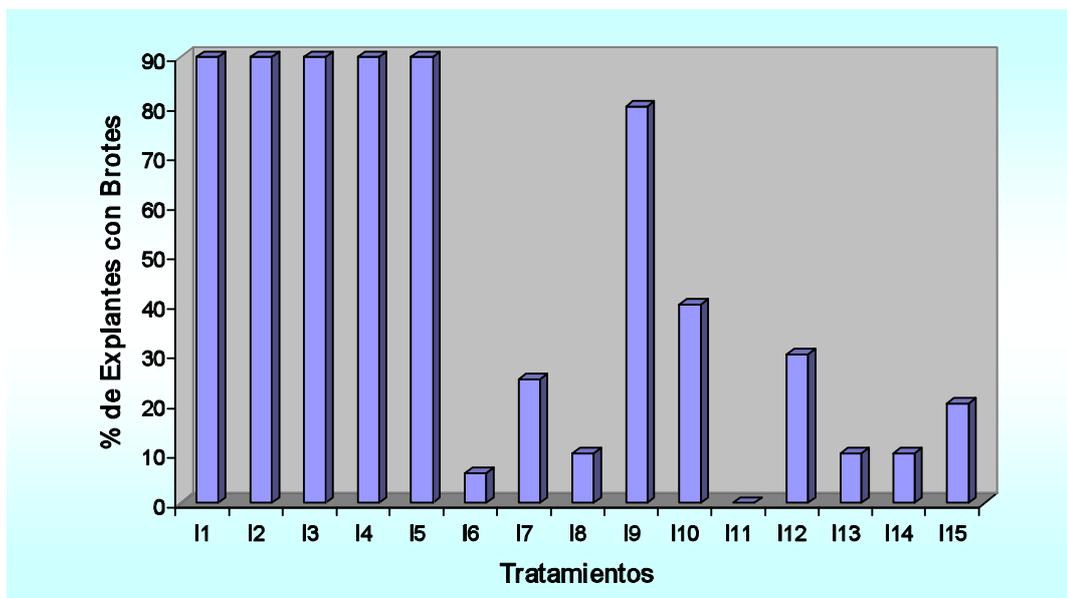


Figura 13. Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 2) sobre la inducción de brotes en explantes de fñame Pico de Botella (*D. alata*) después de 8 días de incubación durante la etapa de iniciación.

6.4 ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

6.4.1 Influencia de la combinación ANA-BA en la multiplicación de los brotes. Durante el desarrollo de esta fase se observó que el tratamiento M11 (ANA 0.5 mg/L y BA 4.0 mg/L) presentó la tasa de multiplicación más alta, con un promedio de 3.6 segmentos nodales por planta en un período de tiempo de incubación de 20 días, en comparación al resto de tratamientos (Figura 14); de igual forma, este tratamiento registró los mejores resultados en cuanto a altura y a número de hojas por planta se refiere, con un promedio de altura de 4.43 cm. (Figura 15) y un promedio de 4.8 hojas por planta (Figura 16), siendo las plantas obtenidas en este tratamiento las de mejor desarrollo y vigorosidad (Figura 17).

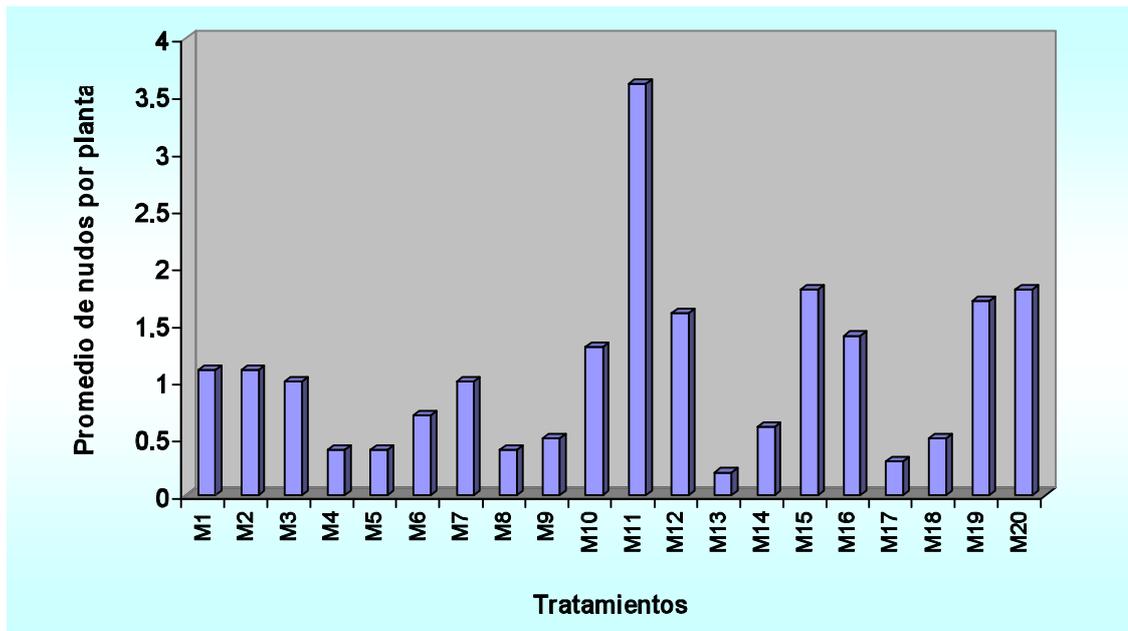


Figura 14. Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 3) sobre la inducción de nudos a partir de brotes en explantes de fñame Pico de Botella (*D. alata*) durante la etapa de multiplicación después de 20 días de incubación.

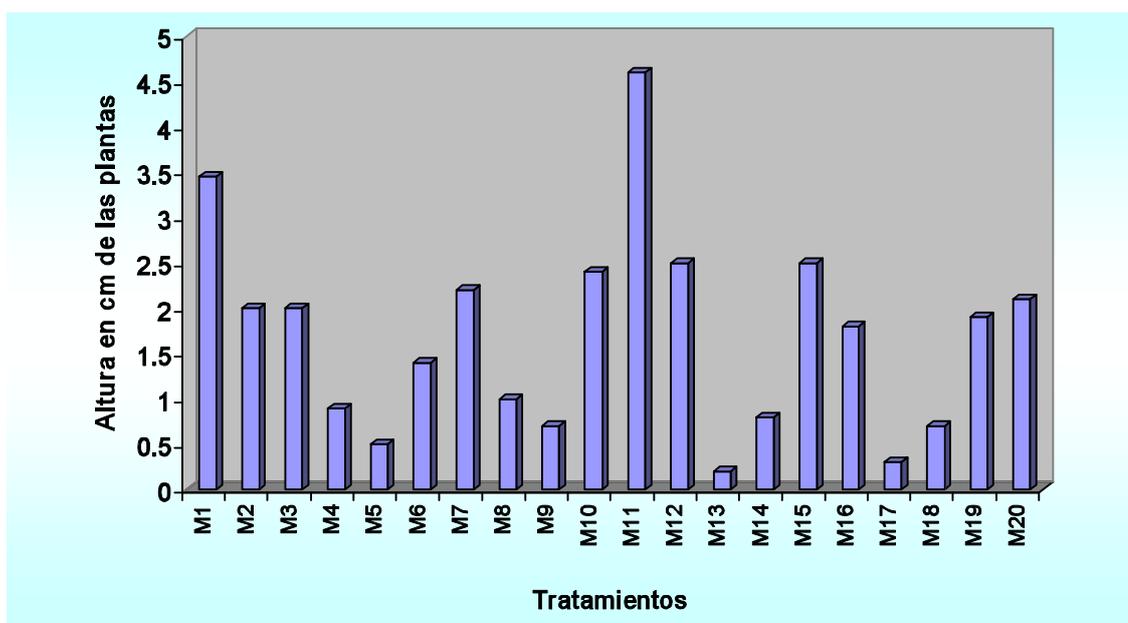


Figura 15. Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 3) sobre la altura alcanzada por las plantas de fñame Pico de Botella (*D. alata*) en la fase de multiplicación durante el período de incubación de 20 días.

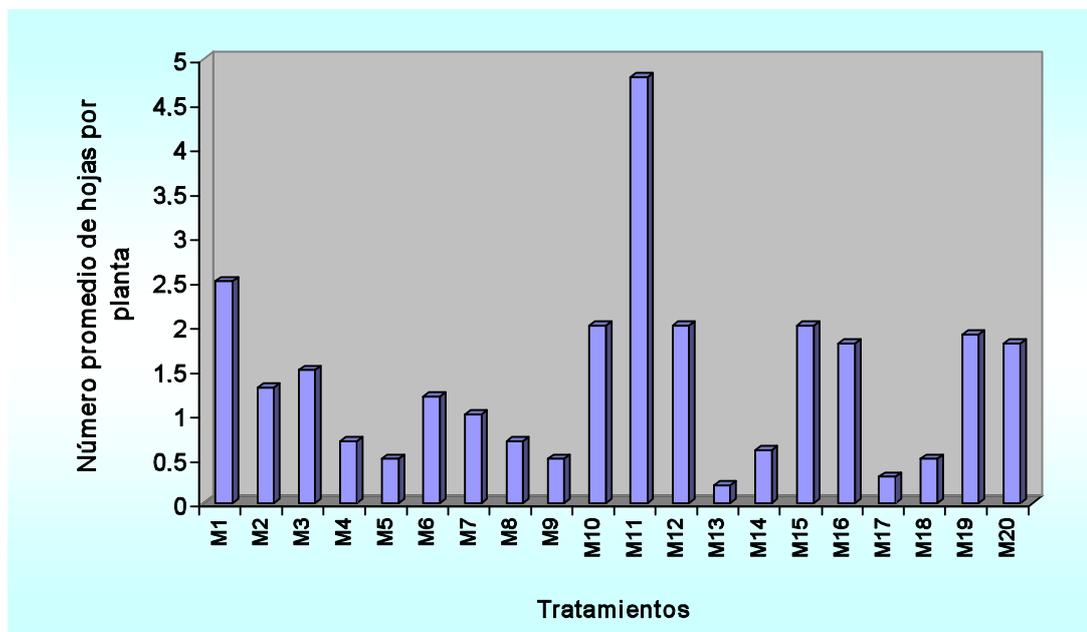


Figura 16. Efecto de los diferentes tratamientos hormonales ANA-BA (ver cuadro 3) sobre el desarrollo de las hojas en plantas de ñame Pico de Botella (*D. alata*) durante un período de incubación de 20 días en la etapa de multiplicación.



Figura 17. Planta de ñame Pico de Botella (*D. alata*) mostrando un buen grado de vigorosidad después de 20 días de incubación en el tratamiento M11 (ANA 0.5 mg/L-BA 4.0 mg/L), durante la etapa de multiplicación.

Otro aspecto notorio que se presentó en el tratamiento M11 fue la presencia de raíces bien definidas, con un promedio de 2.87 raíces/planta y 4.16 cm. de longitud en promedio (Figura 18). Este desarrollo de raíces se presentó de forma conjunta con el desarrollo de segmentos nodales a partir de los brotes.

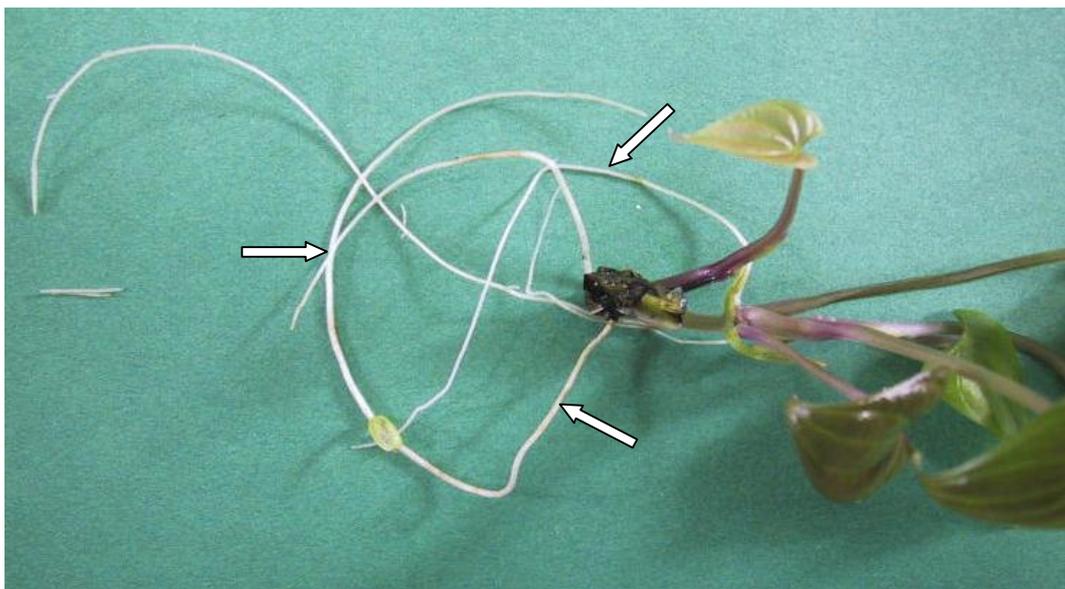


Figura 18. Planta de ñame Pico de Botella (*D. alata*) obtenida en la etapa de multiplicación con el tratamiento M11 (ANA 0.5 mg/L-BA 4.0 mg/L) presentando un adecuado desarrollo del sistema radicular después de 20 días de incubación.

6.4.2 Ciclo de subcultivos. En esta etapa los mejores resultados se observaron empleando el medio S3 (ANA 0.5 mg/L y BA 4.0 mg/L), el cual presenta una tasa de multiplicación de 3.3, una altura promedio de 3.9 cm. por planta, un promedio de 4.2 hojas por planta, un promedio de 2.8 raíces por planta y una longitud promedio de 4.1 cm. por raíz (figura 19), estos resultados se presentaron durante los primeros 20 días de cada subcultivo, observándose un leve deterioro progresivo del material vegetal.



Figura 19. Influencia de la combinación hormonal ANA-BA sobre la obtención de plantas *in vitro* de ñame Pico de Botella (*D. alata*) después de 20 días de incubación durante la fase de subcultivos (ver cuadro 4).

6.5 ETAPA DE ENRAIZAMIENTO

En esta etapa se presentó desarrollo de raíces en todos los tratamientos, siendo los tratamientos E4, E17, E2, E8, y E9 los de mejores resultados, en cuanto a número de raíces por planta respecta (Figura 20) con promedios de 3.2, 2.9, 2.8, 2.8 y 2.8 respectivamente, mientras que los mejores resultados en cuanto a la longitud de las raíces se refiere, se observaron en los tratamientos E3, E13, E8 y E4 con una longitud promedio de 3.33, 2.7, 2.66 y 2.65 cm. respectivamente (Figura 21).

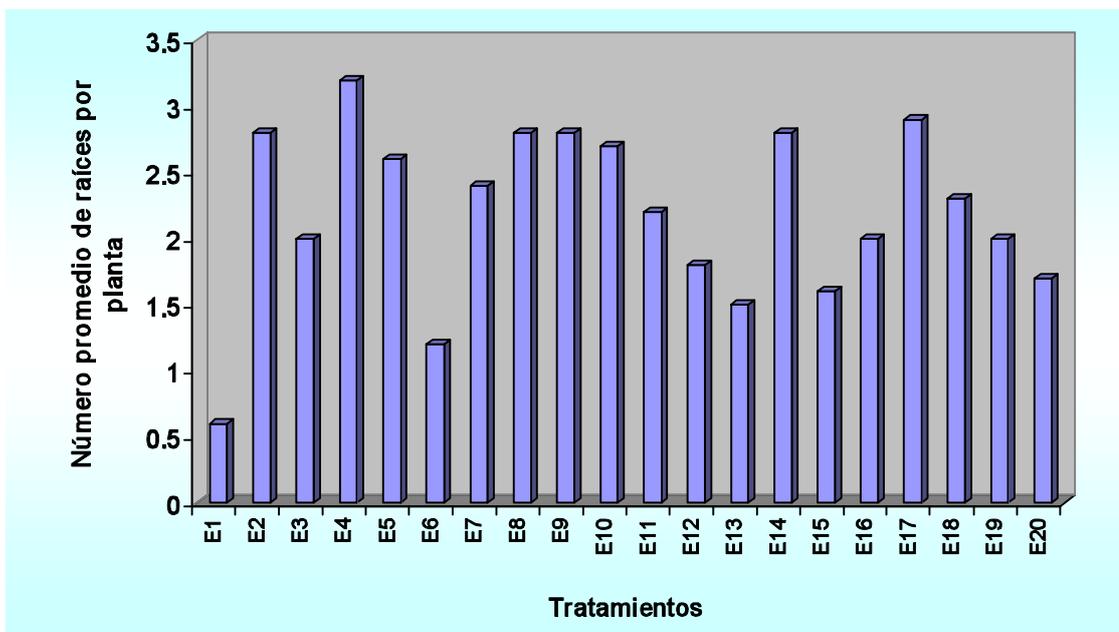


Figura 20. Efecto de los diferentes tratamientos (ver cuadro 5) realizados durante la etapa de enraizamiento sobre la inducción de raíces en plántulas de ñame Pico de Botella (*D. alata*) durante un periodo de incubación de 30 días.

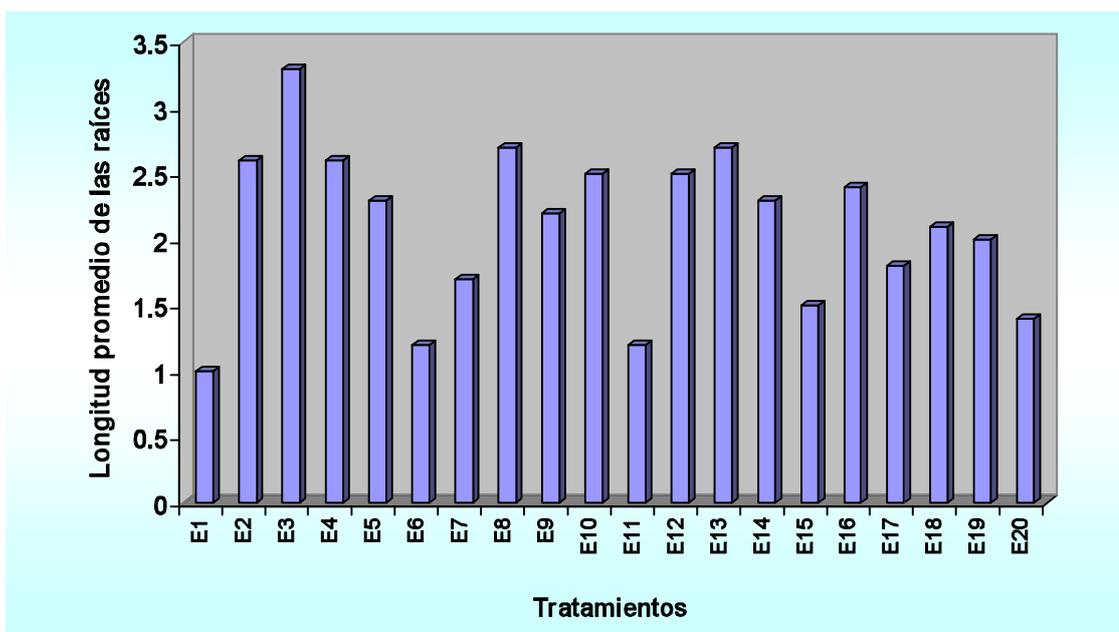


Figura 21. Efecto de los diferentes tratamientos (ver cuadro 5) realizados durante la etapa de enraizamiento sobre la longitud promedio de raíces en plántulas de ñame Pico de Botella (*D. alata*) en un periodo de incubación de 30 días.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1 OBTENCIÓN DE PLANTAS MADRES

El tipo de sustrato y de semillas empleados para la obtención de plantas madres presentaron un alto grado de eficiencia, denotados en el porcentaje y tiempo de germinación, así como en la vigorosidad de las plantas madres obtenidas. Además, el uso de plantas madres con una edad oscilante entre los 2 y 3 meses de edad permite una alta capacidad de regeneración de plantas a partir de los explantes después del corte y la siembra de los mismos en el respectivo medio de cultivo.

7.2 DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES

Hubo diferencias estadísticas significativas ($\alpha=5\%$, anexo 4.1) entre los tratamientos de desinfección de los explantes de ame “pico de botella” (*D. alata*) con hipoclorito de sodio (NaOCl), siendo los mejores tratamientos (cuadro 1, figura 8) los que presentan una concentración de 1%, 2% y 3% de NaOCl con un tiempo de inmersión de 20 minutos, y a la concentración de 3% de NaOCl durante 15 minutos de inmersión de los explantes de ñame; lo cual indica que se puede utilizar el NaOCl en un rango de concentración de 1 a 3% pero con un periodo de inmersión de 20 minutos. Sin embargo, para el número de explantes no necróticos se encontró que hay diferencias estadísticas altamente significativas ($\alpha=1$ y 5%, anexo 4.2) entre los tratamientos, siendo los de mejor resultados:

D1,D2,D3 Y D5 (cuadro 1, figura 9). Lo anterior indica que el tratamiento de desinfección de explantes de ñame “pico de botella” (*D. alata*) con NaOCl a la concentración de 1.0% con un tiempo de inmersión de 20 minutos, permite obtener un eficiente proceso de desinfección; resultado que contradice lo propuesto por Mantell en 1979, quien plantea la utilización de NaOCl 0.5% (v/v) durante 5 minutos de inmersión en la desinfección de segmentos nodales de *D. alata* y *D. roundata* obtenidos de plantas madres establecidas (y mantenidas) en invernaderos. Estos resultados sugieren que el proceso de desinfección está en dependencia de las condiciones de asepsia en la que se establezcan y mantengan las plantas madres.

7.3 ETAPA DE INICIACIÓN

7.3.1 Escisión de los explantes. El corte longitudinal realizado a los segmentos nodales para el aprovechamiento de ambas yemas por separado, causó graves lesiones a los tejidos y mayor producción de fenoles, conllevando a la posterior muerte de los explantes, causando así la pérdida total del material vegetal, resultados que no concuerdan con los obtenidos por Acosta (2001), donde se favoreció la tasa de germinación realizando cortes longitudinales a segmentos nodales de *D. roundata* para separar las yemas, lo cual sugiere que la respuesta a este tipo de cortes en segmentos nodales varía según la especie a trabajar.

7.3.2 Influencia de la combinación ANA-BA sobre la formación de brotes en los explantes. En la etapa de iniciación, en cuanto al total de explantes con brotes inducidos, se encontraron diferencias estadísticas

altamente significativas ($\alpha=1$ y 5%, anexo 5.1) entre los tratamientos evaluados (cuadro 2), encontrándose como mejores tratamientos aquellos en los cuales se utilizó una concentración de 0.0 mg/L de ANA y una concentración de BA hasta de 1.0 mg/L y donde se utilizó 0.3 y 0.2 mg/L de ANA y BA respectivamente (tratamiento I12, figura 11). Para la formación de brotes por explantes hubo diferencias estadísticas altamente significativas ($\alpha=1$ y 5%, anexo 5.2) entre los tratamientos utilizados (cuadro 2), donde se definieron como mejores tratamientos aquellos en los cuales no se utilizó ANA, y en cambio se empleó una concentración de 0.7 mg/L o 1.0 mg/L de BA (cuadro 2, figura 12 y 13). De acuerdo con este análisis en la etapa de iniciación, para obtener explantes con un mayor número de brotes no es necesario utilizar ANA, pero sí una concentración entre 0.7 y 1.0 mg/L de BA. Sin embargo, se puede considerar al tratamiento I1 (sales de Murashige y Skoog sin reguladores de crecimiento, cuadro 2) como el más eficiente, dado que pasados ocho (8) días después de la siembra de los explantes (de 2 a 3 meses de edad) en este tratamiento, los brotes han alcanzado una altura igual o superior a 1.0 cm y pasados 11 días han alcanzado la formación de un segmento nodal y de hojas bien definidas (figura 22).

Estos resultados no coinciden con los propuestos por Cortés y Jung (1983), quienes obtuvieron la mejor respuesta en la inducción de brotes a partir de segmentos nodales de *D. rotundata* C.V. Habanero suplementando el medio M.S. con 2 mg/L de Kinetina e igual concentración de AIA (ácido indolacético). Más sin embargo, sí coinciden con los descritos por Udebo (1971), quien obtuvo plantas

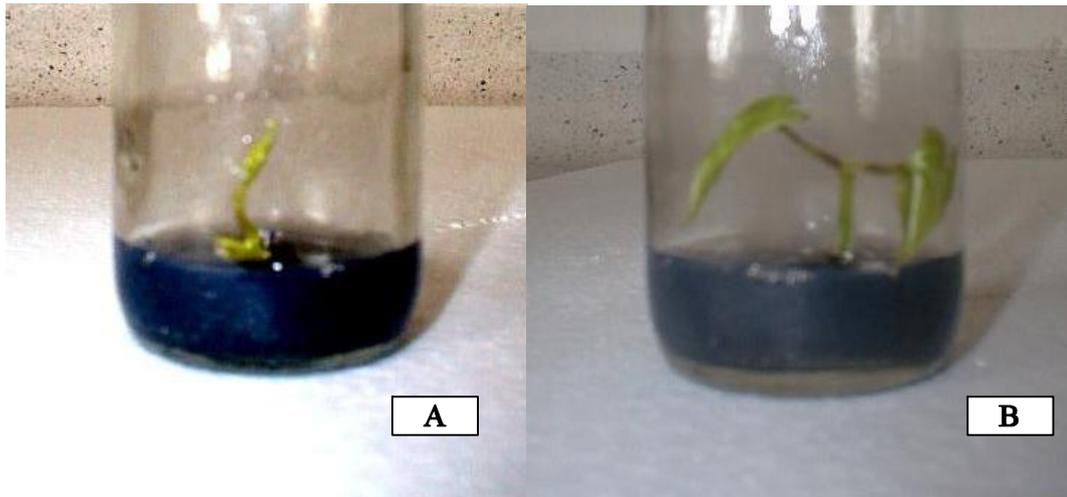


Figura 22. Efectos del tratamiento I1(M.S.en ausencia de reguladores de crecimiento) sobre la inducción y desarrollo de brotes en explantes de fñame Pico de Botella (*D. alata*).(A) Desarrollo de brotes de 1.0 cm. de altura después de 8 días de incubación. (B) Desarrollo de 1.0 nudo y varias hojas pasados 11 días de incubación.

completas de *D. buibiêra* en ausencia de reguladores de crecimiento, de igual forma que Preston y Haun (1961) quienes produjeron nuevas plantas a partir de *D. spiculifera* en ausencia de reguladores de crecimiento y utilizando fotoperíodos de 16 h luz. Estas diferencias en los resultados pueden deberse a la cantidad de reguladores de crecimiento de tipo natural presentes en los explantes al momento de estos ser escindidos de las plantas madres y sembrados en el respectivo medio de cultivo, sin embargo no hay que dejar de lado la edad del explante, ya que cuando se trabajó con explantes de *D. alata* c.v. Pico de Botella con una edad entre 3 y 4 meses se hizo necesario la utilización del tratamiento I2 (0.2 mg/L BA) para inducir la formación de brotes, resultado que coincide con los publicados por Mantell y sus colaboradores (1978), quienes trabajaron con segmentos nodales de *D. alata* L. y *D. rotundata* poir de diferentes edades para cada especie, por

lo cual se puede inferir que segmentos nodales que difieren en edad pueden presentar diferentes respuestas en su crecimiento *in vitro*.

7.4 ETAPA DE MULTIPLICACIÓN

7.4.1 Influencia de la combinación ANA-BA en la multiplicación de los brotes. El análisis estadístico de resultados, en cuanto a la multiplicación de los brotes, muestra diferencias altamente significativas ($\alpha=1$ y 5%, anexo 6.1, 6.2 y 6.3) entre los tratamientos, siendo el de mejor resultado el M11 (cuadro 3, figuras 14, 15 y 16), que presenta una combinación ANA-BA en concentraciones de 0.5 mg/l y 4.0 mg/L respectivamente, con un con una tasa de multiplicación de 3.6 (segmentos nodales por planta) durante un periodo de incubación de 20 días; resultados que se asemejan a los publicados por Lauzer y Colaboradores (1992), quienes trabajaron con segmentos nodales de *D. abyssinica* y *D. mangenotiana*, obteniendo una tasa de multiplicación que varía de 4 a 5 nudos por segmento nodal cultivado en un período de incubación de 6 semanas y un fotoperíodo de 16 horas luz a condiciones ambientales y, a los obtenidos por Mantell y colaboradores (1978), quienes obtuvieron una tasa de multiplicación de 3 a 5 nudos en un período de incubación entre 14 y 20 días, trabajando con segmentos nodales de *D. alata* y *D. rotundata* con un fotoperíodo de 16 horas luz.

La relación auxina – citosina que presenta el tratamiento M11 (0.5 mg/L ANA – 4.0 mg/L BA) en una proporción de 1:8 respectivamente resultó ser muy eficiente en el desarrollo de las vitroplantas, obteniéndose plantas con un alto nivel de uniformidad, debido a que una proporción

citocínica alta con respecto a la auxina favorece la formación de yemas y si las citocinas son aplicadas exógenamente (al medio de cultivo) en general activan el crecimiento de las yemas laterales, Merino y Hurtado (1994). Estudiando la acción de cada uno de estos reguladores de crecimiento (ANA y BA) sobre el desarrollo de las plantas, tenemos que la presencia de ANA (Auxina) en baja concentración (0.5 mg/L) en el medio de cultivo favorece el crecimiento de los brotes por alargamiento celular, ya sea incrementando el contenido osmótico de la célula y la permeabilidad del agua, reduciendo la presión de la pared o aumentando la síntesis de ARN, enzimas y aún de la misma pared, provocando un aumento en la plasticidad de la pared celular, trayendo como consecuencia su extensión y con ello un crecimiento por alargamiento (Devlin, 1980). De igual forma sucede con la formación y promoción del crecimiento de las raíces presentadas por las plantas obtenidas con este tratamiento. Por su parte, la adición al medio de cultivo de BA en una concentración relativamente alta (4.0 mg/L) favoreció el desarrollo de los brotes, estimulando la división celular y más específicamente el proceso de mitosis. Sin embargo, hay que tener en cuenta el sinergismo entre estos reguladores de crecimiento para que cumplan eficazmente su acción sobre los respectivos tejidos de los explantes, de tal forma que ambos (ANA-BA) deben estar presentes en el medio de cultivo (Wareing y Phillips, 1973). Además, según Merino y Hurtado (1994), una buena relación en la proporción Auxina – Citosina permite la obtención y desarrollo de meristemos, tanto apicales como radiculares, lo cuál explica el buen desarrollo de tallos y raíces obtenidos en plantas provenientes del tratamiento M11.

7.4.2 Ciclo de subcultivos. Se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ($\alpha=1$ y 5%, anexo 7.1, 7.2 y 7.3) entre los tratamientos empleados en esta fase, dentro de los cuales la combinación ANA-BA (0.5 mg/L – 4.0 mg/L) respectivamente denominada tratamiento S3 en esta etapa (cuadro 4), fue eficiente en la propagación continua de los segmentos nodales, permitiendo obtener plantas bien desarrolladas (Figura 23) con una tasa de multiplicación promedio de 3.3 segmentos nodales por explante cultivado durante 5 ciclos de subcultivos de 20 días cada uno. Si se mantiene esta tasa de propagación es posible obtener hasta 46.411 plantas en seis meses de cultivo. Mantell y colaboradores (1978) reportaron una tasa de propagación entre 3 y 5 en *D. alata* y *D. rotundata*, estimando que podrían obtener 65.000 en seis meses con un ciclo de subcultivos de 14 a 20 días cada uno. Las diferencias presentadas en la respuesta *in vitro*, en este caso representadas en la tasa de multiplicación, entre una misma o varias especies han sido comúnmente reportadas y pueden ser ocasionadas por diferencias en el tamaño de los explantes (Lauzer y colaboradores, 1992) o por factores más complejos como azúcares, fosfatos, compuestos fenolíticos, luz, temperatura, consistencia del medio y aun por la calidad y tipo de tejido empleado (Wareing y Phillips, 1973).

7.5 ETAPA DE ENRAIZAMIENTO

En lo que respecta a la inducción y desarrollo de raíces en plántulas de ñame pico de botella (*D. alata*), se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas ($\alpha=1$ y 5%, anexo 8.1 y 8.2) entre lo

tratamientos; observándose que la relación entre ANA y el porcentaje de sales básicas del medio M.S. de los tratamientos E4 y E2 (cuadro 5, figuras 20 y 21) favorecieron la formación y desarrollo de las



Figura 23. Planta de ñame Pico de Botella (*D. alata*) obtenida durante la fase de subcultivo con el tratamiento S3 (ANA 0.5 mg/L-BA 4.0 mg/L) mostrando un buen desarrollo y la presencia de varios nudos.

raíces, resultados que se explican con lo propuesto por Harman y Kester en 1987, quienes afirman que los niveles de auxina deben aumentarse y suprimirse los de citoquinas para inducir la formación de raíces y luego transferir éstas a un medio libre de reguladores de crecimiento para que elonguen. Sin embargo, los resultados obtenidos en estos dos

tratamientos son inferiores a los obtenidos en el tratamiento M11 (ANA 0.5 mg/L – BA 4.0 mg/L) de la fase de multiplicación, el cual presenta contenido auxínico y citocínico en el medio de cultivo (Figura 24).

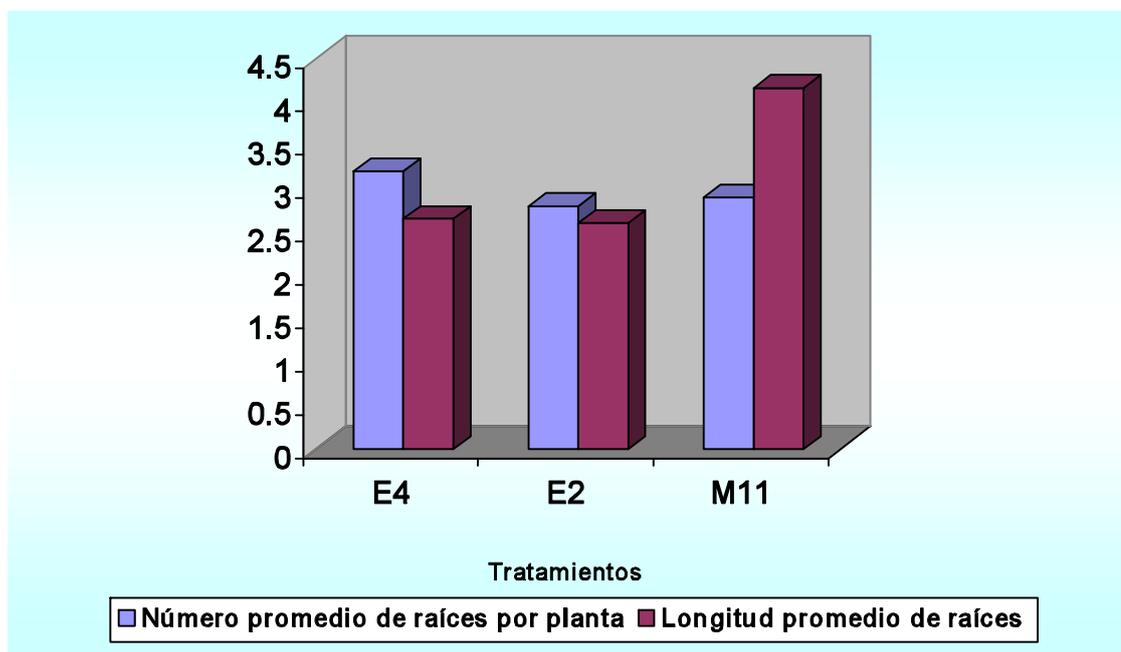


Figura 24. Efecto de los tratamientos E4 (ANA 0,8 mg/L – sales M. S. al 100%), E2 (ANA 0,2 mg/L – sales M. S. al 100%) y M11 (ANA 0.5 mg/L – BA 4.0 g/L) sobre la inducción y la longitud promedio de raíces en plántulas de ñame Pico de Botella (*D. alata*) durante 20 días de incubación.

CONCLUSIONES

- Las plantas madres de ñame Pico de Botella (*D. alata*) con una edad de 2 a 3 meses proporcionan explantes (segmentos nodales) con un adecuado estado fisiológico para su micropopagación empleando la técnica de propagación clonal a través de segmentos nodales.
- El tratamiento inicial de los explantes (segmentos nodales) de ñame Pico de Botella (*D. alata*) con etanol (70%) por 1.0 minuto Y H₂O₂ (2%) por 2.0 minutos, seguido de la aplicación de NaOCl (1.0 %) por 20 minutos, favorece en forma muy eficiente la desinfección de los explantes.
- El corte longitudinal realizado a los explantes (segmentos nodales) de ñame Pico de Botella (*D. alata*) para separar las dos yemas, no permite la inducción de brotes, haciendo así inviable el proceso de micropropagación.
- El medio de cultivo de sales básicas de Murashige y Skoog (M. S.) en ausencia de reguladores de crecimiento favorece eficientemente la inducción y desarrollo de brotes a partir de los explantes (segmentos nodales) durante la etapa de iniciación.

- La adición al medio de cultivo M. S. de la combinación de los reguladores de crecimiento ANA – BA en concentraciones de 0.5 mg/L y 4.0 mg/L respectivamente, permite la inducción de nudos y el desarrollo de vitro plantas de buen vigor en una forma muy eficiente.

- El medio M. S. suplementado con ANA y BA en concentraciones de 0.5 mg/L y 4.0 mg/L respectivamente, permite mantener una buena tasa de multiplicación en forma constante durante 5 ciclos de subcultivos.

- La inducción y desarrollo de raíces se puede realizar al tiempo que la inducción y desarrollo de segmentos nodales, sin necesidad de suprimir las citocinas y aumentar la concentración de auxinas.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios sobre el control de la fenolización en los explantes de (*D. alata*) C.V. “Pico de Botella” que permitan hacer menos dispendioso y más eficiente el trabajo con este material vegetal.
- Determinar el fotoperiodo ideal para el desarrollo de los explantes y que permita mejorar la tasa de multiplicación y eficiencia del proceso.
- Estudiar el contenido natural de los reguladores de crecimiento presentes en los explantes de *D. alata* C.V. “Pico de Botella” y la asimilación externa (presentes en el medio de cultivo) de los mismos para una mejor comprensión y control de su desarrollo *in vitro*.
- Realizar un estudio detallado sobre el comportamiento de plantas de ñame Pico de Botella (*D. alata*) durante la etapa de aclimatación, que permita asegurar un aprovechamiento máximo de las plantas obtenidas *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, Carlos. El cultivo de ñame. Bogotá: TOA, 1980. 75 p.

ACOSTA, R. C. Estandarización de la técnica de micropropagación para la obtención masiva de plantas de ñame espino (*Dioscorea rotundata*) mediante el cultivo *in vitro* de segmentos nodales. Sincelejo 2001. 119 P. Tesis (Biología – Énfasis en Biotecnología). Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias. Departamento de Biología.

AMMIRATO, P.V. Handbook of plant Cell Cultive YAM. Tomo IV. Mac Millan Publishing CO New York. 1983. p. 327 – 355.

APPLEZWEIG, N. Dioscorea – The pill crop. In: Crop Resources (D.S. Seigler, ed). Academic Press. New York. 1997 p149 – 163.

ASIEDU, J. J. Processing and Phisical chemical properties of tropical products. Pfaffenwiler: centaurus – Verlagsgesellschaft, 1986. p. 379 – 389.

AYENSU, E.S. Anatomy of the Monocoty lednos. VI. Dioscoreales. Oxford Univ. press, New York. 1972.

BRUNT, A.A., JACKSON, G.V.H. and FRISON, E.A. 1989. FAO/IBPGR Technical Guidelines for the Safe Movement of Yam Germplasm. Food Agriculture Organization of the United Nations, Rome/International Board for Plant Genetic Resources, Rome. p20.

COCHRAN, William y COX, Gertude. Diseños experimentales 2° ed. México,1990. 661p.

CORTES, A y JUNG, L. Tissue Culture Propagation of yam In Puerto Rico. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico. Vol. 67. No. 4: 1983. p. 418 – 428.

DEVLIN, R. M. (1980). Fisiología Vegetal. Editorial Omega. Barcelona, España.

D. LAUZER; G. LAUBLING; G. VICENT y M. CAPPADOCIA (1992). In vitro propagation and cytology of wild yams, *Dioscorea abyssinica hoch.* And *D. mangeniiiana miege.* Plant cell, Tissue and organ culture Vol. 28: 215 – 223 P. Kluwer Academic Publishers. Printed in Netherlands.

EDWARDS, D. the industrial manufacture of cassava products: An economic study. Inglaterra: TPI, 1974. p. 27.

HARTMANN, H. & Kester, D. propagación de plantas. Compañía editorial continental, S. A de C. V. 2 ed. México, 1987. p. 760.

HURTADO, Daniel & MERINO, Maria Eugenia. Cultivo de tejidos Vegetales. Trillas. México, 1994. p. 232.

MANTELL, S. H. Apical Meristem Tip Culture for Eradication of Flexoos rod Viruses in Yam (*Dioscorea alata*). Tropical pest Management. Vol. 26 (2): 1980. p.170 – 179. Crown copyright.

----- & Twyforel, C.T. Production of somatic embryos and plantlets from root cell of the Greater Yam. Netherlands. Plant Cell. Tissue and Organ. 1996. p. 17 –26.

----- HAQUE, S. Q. And WHITEHALL, A. P. (1978). Clonal multiplication of *Dioscorea alata poir.* . Yams by tissue culture. Caribbean Agricultural Research and Development Institute, St Augustine, Trinidad. Journal of Horticultural Science, 53, 95 – 98.

----- (1979). A rapid propagation system for yam. Caribbean Agricultural Research and Development Institute, St Augustine, Trinidad. Yam Virus Project, Bulletin No. 1, 3 – 19.

MARTIN, F.W. Tropical yams and their potential, part 2, *Dioscorea alata*. USDA agriculture Handbook No. 495, Agricultural Research Service, Washington, D.C.1976.

OSORIO, C. Y RAMIREZ, N. Principales enfermedades del ñame en la región caribe colombiana. ICA – INFORMA. Vol. 23 No. 1: 1989. p. 13 –19 .

PEREA, M et al. Aumento en la proliferación de brotes a partir de segmentos nodales (*D. alata*) mediante el empleo de thiadiazuron y BAP. programa Regional para la Producción de semillas de Ñame Libre de Patógenos. Vol. 1 (1): 1998. p. 3 – 6.

PEREZ, D. J. Determinación de parámetros para el secado de ñame (*Dioscorea alata* L.). Sincelejo, 1990. 78p. IL. Tesis (Ingeniero Agrícola). Universidad de Sucre. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Agrícola.

PRESTON, W. B. and HAUN, T. R. (1962). Factors involved in the vegetative propagation of *Discorea spiculifera*, *seml*. Proceeding of the American Society for Horticultural Science, 80, 417 – 29.

ROCA, William M. cultivo de tejidos en la agricultura, Fundamentos y Aplicaciones, ed. Centro internacional de Agricultura Tropical. Cali – Colombia, 1991. p. 969.

UDEBO, A. E. (1971). Effect of external supply of growth substances on axillary proliferation and development in *Discorea bubifera*. Annals of botany, 35, 169 – 63.

VILLORDON, A. Q. Genetre variation among *sweet potatoes* propagated through nodal and adventitiouts. Journal of the American Society for Horticultural Science. 121 (2): 1996. p. 170 – 174.

WOLFGANG, W & HYEON, Y. P. Plant Cell Tissue and Organ Culture. Vol. 34: 101 – 105p. Klower Academic Publishers. Priend in the Netherlands.

WAREING, R. F. y PHILIPS, I. D. J. (1973). The control of growth and differentiation in plants, pergamon press., L.T.D., Gran Bretaña.

ANEXOS

Anexo 1. Ñame: Área, producción y rendimiento obtenido por departamento. Año: 1988 – 1997

Dpto	var.	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997
Atlántico	Sup.	400	500		210	161	75	84	107	38	315
	Pro.	4000	6000		1950	1735	700	878	1098	360	4411
	Ren.	10000	12000		9286	10776	9333	10452	10262	9474	14003
Bolívar	Sup.	3500	7600	3190	4390	5155	1769	6020	3352	7655	2060
	Pro.	31500	30400	20900	35120	62972	24005	61875	42707	85570	23266
	Ren.	9000	4000	6552	8000	12216	13570	10278	12741	11178	11294
Córdoba	Sup.	7700	7000	927	735	638	3458	4094	5608	6960	6747
	Pro.	61600	48300	1824	4410	4948	44380	43870	61215	66204	68162
	Ren.	8000	6900	1968	6000	7755	12834	10471	10916	9512	10103
Sucre	Sup.	4000	4500	26	42	283	480	896	1142	1730	2190
	Pro.	24000	22500	105	504	2830	5808	8927	11870	16987	19566
	Ren.	6000	5000	4038	12000	10000	12100	9963	10394	9819	8936

Sup: Superficie en hectáreas.
 Pro: Producción en toneladas.
 Ren: Rendimiento en kg/ha.

Fuente: Evaluaciones agropecuarias URPA's UMATA's. Minagricultura y desarrollo rural – oficina de información y estadística.

Anexo 2. Composición de los tubérculos en diferentes especies de ñame, comparados con los de papa, batata y yuca.

Especies	Humedad b. H. %	Carbohidratos %	Grasa %	Proteína cruda %	Fibra cruda %	Cenizas %
Names						
Batata	65 - 73	22 - 29	0,03-0,27	1,12 - 2,78	0,65-1,40	0,67-2,56
rotundata	58 - 73	23	0,12	1,09-1,99	0,35-0,79	0,68-2,56
esculenta	67 - 81	17 - 25	0,04-0,29	1,29-1,87	0,18-1,51	0,50-1,24
bulbifera	63 - 67	27 - 33	0,04	1,12-1,50	0,70-0,79	1,08-1,51
Trífida	---	38	0,44	2,54	---	---
Papas						
Papa	68 - 82	14 - 27	0,02-0,18	1,14-2,98	0,28-0,85	0,78-1,16
Batata	58 - 81	17 - 43	0,18-1,16	0,45-4,37	0,60-4,54	0,66-1,98
Yuca	65 - 70	20 - 30	0,18-0,50	1,00 - 2,00	1,00-2,00	0,50- 1,00

Fuente: Asiedu, J. J. Processing and physical chemical properties of products. Pfaffenwiler: Centaurus – Verlagsgesellschaft, 1986. P. 379-385.

Anexo 3. Componentes del medio de cultivo Murashige Skoog 1962.

Nutrimientos	Mg. / litro	mM
NH ₄ NO ₃	1650	20.6
KNO ₃	1900	18.8
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	3.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	1.5
KH ₂ PO ₄	170	1.25
KI	0.83	5.0
H ₃ B O ₃	6.2	100
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	100
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	30
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.0
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.1
Na ₂ EITA	37.3	100
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	100
Sacarosa	30000	
Mioinositol	100	
Agar	8000	
PH	5.7 – 5.8	

Anexo 4. Análisis estadístico para la evaluación de los diferentes tratamientos utilizados en la desinfección de los explantes.

4.1 Análisis de varianza para el total de explantes no contaminados.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					5%	.1%
Tratamientos	8	2.022	0.252	2.22 *	2.07	2.77
Bloques	9	0.9	0.1	0.88 ns	2.01	2.67
Error	72	8.2	0.113			
Total	89	11.122				

** Diferencia altamente significativa. C.V.= 0.393%

* Diferencia significativa.

ns: No hay diferencia estadística.

Prueba de Duncan para el total de explantes no contaminados

Tratamiento	D9	D6	D3	D8	D2	D5	D7	D4	D1
Medias	1	1	1	1	0.9	0.8	0.7	0.7	0.6
Orden de ranqueado	A	A	A	A	A	A	A	A	B

4.2 Análisis de varianza para el total de explantes no necroticos.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					.5%	.1%
Tratamientos	8	19.48	2.436	64.17 **	2.07	2.77
Bloques	9	0.266	2.96E-2	0.78 ns	2.01	2.67
Error	72	2.733	3.79E-2			
Total	89	22.48				

** Diferencia altamente significativa. C.V.= 0.398%

* Diferencia significativa.

ns: No hay diferencia estadística.

Prueba de Duncan para el total de explantes no contaminados

Tratamiento	D1	D4	D3	D2	D5	D6	D8	D7	D9
Medias	1	1	1	1	0.3	0.09	0.0	0.0	0.0
Orden de ranqueado	A	A	A	A	B	C	D	D	D

Anexo 6. Análisis estadístico para la evaluación de los diferentes tratamientos utilizados en la etapa de multiplicación.

6.1 Análisis de varianza para el numero de nudos por planta.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					.5%	.1%
Tratamientos	19	119.85	6.308	21.84 **	1.65	2.03
Bloques	9	2.905	0.322	1.12 ns	1.95	2.56
Error	171	49.39	0.288			
Total	199	172.15				

** Diferencia altamente significativa. . C.V.= 98.90%

* Diferencia significativa.

ns: No hay diferencia estadística.

Prueba de Duncan para el numero de nudos por planta

Tratamientos	X de los tratamientos	Orden de ranqueado
M11	3.6	A
M15	1.8	B
M20	1.8	B
M19	1.7	B
M12	1.6	B
M16	1.4	B
M10	1.2	B
M1	1.1	C
M2	1.1	C
M3	1.0	C
M7	1.0	C
M6	0.7	C
M14	0.6	D
M9	0.5	D
M18	0.5	D
M8	0.4	D
M4	0.4	D
M5	0.4	D
M17	0.3	D
M13	0.2	D

6.2 Análisis de varianza para el promedio de altura de las plantas en los distintos tratamientos de la fase de multiplicación.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					.5%	.1%
Tratamientos	19	237.672	12.509	16.24 **	1.65	2.03
Bloques	9	7.586	0.842	1.09 ns	1.95	2.56
Error	171	131.677	0.770			
Total	199	376.936				

** Diferencia altamente significativa. C.V.= 51.69%

* Diferencia significativa.

ns: No hay diferencia estadística.

Prueba de Duncan para el promedio de altura de las plantas en los distintos tratamientos de la fase de multiplicación.

Tratamientos	X de los tratamientos	Orden de ranqueado
M11	4.63	A
M1	3.45	B
M15	2.49	C
M12	2.48	C
M10	2.40	C
M7	2.20	C
M20	2.12	C
M2	2.05	C
M3	2.00	C
M19	1.93	C
M16	1.82	C
M6	1.40	D
M8	1.05	D
M4	0.90	D
M14	0.79	D
M9	0.70	D
M18	0.67	D
M5	0.50	E
M17	0.30	E
M13	0.20	E

6.3 Análisis de varianza para el número de hojas por planta en los distintos tratamientos de la fase de multiplicación.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					.5%	.1%
Tratamientos	19	213.38	11.230	19.67 **	1.65	2.03
Bloques	9	4.58	0.508	0.89 ns	1.95	2.56
Error	171	97.62	0.570			
Total	199	315.58				

** Diferencia altamente significativa. . C.V.= 54.31%

* Diferencia significativa.

ns: No hay diferencia estadística.

Prueba de Duncan para el número de hojas por planta en los distintos tratamientos de la fase de multiplicación.

Tratamientos	X de los tratamientos	Orden de ranqueado
M11	4.8	A
M1	2.5	B
M10	2.0	B
M15	2.0	B
M12	2.0	B
M19	1.9	B
M20	1.8	B
M16	1.8	B
M3	1.5	C
M2	1.3	C
M6	1.2	C
M7	1.0	C
M4	0.7	C
M8	0.7	C
M14	0.6	D
M5	0.5	D
M9	0.5	D
M18	0.5	D
M17	0.3	D
M13	0.2	D

Anexo 7. Análisis estadístico para la evaluación de los diferentes tratamientos empleados en la fase de subcultivos

7.1 Análisis de varianza para el número de nudos por planta.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					.5%	.1%
Tratamientos	4	18.809	4.702	40.51 **	2.63	3.89
Bloques	9	1.411	0.156	1.35 ns	2.15	2.94
Error	36	4.178	0.116			
Total	49	24.399				

** Diferencia altamente significativa. C.V.= 16.24%

* Diferencia significativa.

ns: No hay diferencia estadística.

Prueba de Duncan para el número de nudos por planta.

Tratamiento	S3	S1	S2	S4	S5
X de los tratamiento	3.28	2.01	1.93	1.70	1.56
Orden de ranqueado	A	B	C	D	E

7.2 Análisis de varianza para la altura promedio de las plantas.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					.5%	.1%
Tratamientos	4	6.925	1.731	12.51 **	2.63	3.89
Bloques	9	1.488	0.165	1.19 ns	2.15	2.94
Error	36	4.982	0.138			
Total	49	13.396				

** Diferencia altamente significativa. C.V.= 11.51%

* Diferencia significativa.

ns: No hay diferencia estadística.

Prueba de Duncan para la altura promedio de las plantas.

Tratamiento	S3	S1	S4	S2	S5
X de los tratamiento	3.86	3.20	3.19	3.19	2.69
Orden de ranqueado	A	B	B	B	C

7.3 Análisis de varianza para el número de hojas promedio por plantas.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					.5%	.1%
Tratamientos	4	9.476	2.369	18.45 **	2.63	3.89
Bloques	9	1.269	0.141	1.10 ns	2.15	2.94
Error	36	4.623	0.128			
Total	49	15.369				

** Diferencia altamente significativa. C.V.= 10.22%

* Diferencia significativa.

ns: No hay diferencia estadística.

Prueba de Duncan para el número de hojas promedio por plantas.

Tratamiento	S3	S4	S2	S1	S5
X de los tratamientos	4.33	3.53	3.27	3.27	3.11
Orden de ranqueado	A	B	C	C	D

Anexo 8. Análisis estadístico para la evaluación de los diferentes tratamientos realizados en la etapa de enraizamiento.

8.1 Análisis de varianza para el número de raíces por planta.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					.5%	.1%
Tratamientos	19	79.455	4.181	5.70 **	1.62	1.97
Bloques	9	12.605	1.400	1.91 ns	1.92	2.50
Error	171	125.495	0.733			
Total	179	217.555				

** Diferencia altamente significativa. C.V.= 39.54%

* Diferencia significativa.

ns: No hay diferencia estadística.

Prueba de Duncan para el numero de raíces por planta.

Tratamientos	X de los tratamientos	Orden de ranqueado
E4	3.2	A
E17	2.9	A
E9	2.8	A
E8	2.8	A
E2	2.8	A
E10	2.7	A
E15	2.6	A
E7	2.4	A
E18	2.3	B
E11	2.2	B
E14	2.2	B
E19	2.0	B
E16	2.0	B
E3	2.0	B
E12	1.8	B
E20	1.7	B
E15	1.6	B
E13	1.5	B
E6	1.2	C
E1	0.6	C

8.2 Análisis de varianza para la longitud promedio de las raíces.

Fuente de variación	gl	SC	CM	F observado	F requerido	
					.5%	.1%
Tratamientos	19	62.746	3.302	3.40 **	1.62	1.97
Bloques	9	17.425	1.936	2.00 *	1.92	2.50
Error	171	165.852	0.969			
Total	179	246.024				

** Diferencia altamente significativa. . C.V.= 106%

* Diferencia significativa.

ns: No hay diferencia estadística.

Prueba de Duncan para la longitud promedio de las raíces.

Tratamientos	X de los tratamientos	Orden de ranqueado
E3	3.33	A
E13	2.70	A
E4	2.65	A
E12	2.62	A
E2	2.60	A
E5	2.48	A
E16	2.39	B
E14	2.34	B
E10	2.25	B
E9	2.21	B
E18	2.11	B
E7	2.03	B
E19	1.89	B
E8	1.82	B
E17	1.77	B
E15	1.59	C
E20	1.55	C
E11	1.28	C
E6	1.27	C
E1	1.05	C