

Optimización de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea spp* por crecimiento mínimo

Optimization of *in vitro* conservation of *Dioscorea spp* germplasm by minimal growth

Lucía Candelaria Díaz Narváez*, Oscar Elías Carmona Wilches**,
Javier Darío Beltrán Herrera***

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50842

Resumen

El ñame Criollo (*Dioscorea alata*) y el ñame Espino (*Dioscorea rotundata*) se constituyen como las dos especies mayormente cultivadas en el departamento de Sucre, Colombia. Por esta razón en la Universidad de Sucre se han implementado técnicas para lograr su conservación mediante la propagación *in vitro*, sin embargo esta metodología conserva las accesiones por un periodo no mayor a los 4 meses, provocando continuos subcultivos, aumento de costos y mano de obra. Por ello la presente investigación tuvo como objetivo establecer medios de cultivo óptimos para la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de diferentes accesiones (*D. alata* y *D. rotundata*) pertenecientes al banco de germoplasma de la Universidad de Sucre, durante un periodo de 8 meses. Esto mediante la modificación del medio de cultivo base MS; con los siguientes osmolitos: sacarosa, manitol y sorbitol. Se evaluaron 8 tratamientos (T) en los siguientes porcentajes T₁ (control) (3:0:0), T₂ (0:1,5:0), T₃ (0:0:2), T₄ (0:1,5:2), T₅ (0:0:1) y T₆ (0:0:3), T₇ (0:1,5:1) y T₈ (0:1,5:3). Cada 30 días se evaluó: supervivencia (%), hojas expandidas (%), longitud del tallo y raíz, número de nudos y raíces, oxidación (%), senescencia foliar (%) y callo (%). Los resultados mostraron que las especies *D. alata* y *D. rotundata*, se conservan de forma óptima, en la combinación T₄ (0:1,5:2), donde se evidencia un alto porcentaje de supervivencia, un mínimo porcentaje de senescencia foliar y un desarrollo restringido en el resto de variables. Garantizando así la disponibilidad y el desarrollo normal de las accesiones en un periodo superior a 4 meses.

Palabras clave: ñame, manitol, sorbitol, sacarosa.

Abstract

Dioscorea alata cv. "Criollo" and *Dioscorea rotundata* cv. "Espino" are constituted as the two cultivars mostly cultivated in the department of Sucre, Colombia. For this reason the University of Sucre has been implementing tissue culture techniques for their multiplication throughout *in vitro* propagation. However, this methodology support accessions for a period about 4 months, causing continuous subcultures, increased costs and labor. Therefore the objective of the present investigation was to establish an optimal culture media for *in vitro* minimal growth conservation of different accessions (*D. alata* and *D. rotundata*) from the University of Sucre yam's genebank, for a period of 8 months by modifying the basic MS culture medium. The following osmolytes were used: sucrose, mannitol and sorbitol in different percentages (S:M:S). Eight treatments (T) in the following percentages were evaluated: T₁ (control) (3:0:0), T₂ (0:1,5:0), T₃ (0:0:2), T₄ (0:1,5:2), T₅ (0:0:1) y T₆ (0:0:3), T₇ (0:1,5:1) y T₈ (0:1,5:3). Every 30 days data was recorded for: survival (%), expanded leaves (%), length of stem and roots, number of leaves and roots, phenolization (%), leaf senescence (%) and callus presence (%). The best results for *D. alata* and *D. rotundata*, were observed in treatment T₄ (0:1,5:2), where a high percentage of survival evidence, a minimum percentage of leaf senescence and a limited response for the other variables. Therefore, these results indicate the potential of this media, to increase 100% *in vitro* growth conservation over the conventional media, and ensuring the viability and normal development of the accessions for more than four months period.

Key words: yam, mannitol, sorbitol, sucrose.

Recibido: junio 10 de 2014

Aprobado: marzo 26 de 2015

* Bióloga. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre. lucadina@537hotmail.com

** Biólogo. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre. menfis2226@hotmail.com

*** Phd. Fitopatología. Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre. darbelt2003@yahoo.com

Introducción

Dioscorea es uno de los seis géneros pertenecientes a la familia *Dioscoreaceae* que comprende más de 650 especies distribuidas en las zonas tropicales de alta pluviosidad (Thurston, 1998). El ñame *Dioscorea* sp, es un tubérculo de gran importancia para los pequeños productores de la región caribe colombiana, de este cultivo dependen numerosas familias de agricultores de esta región (Reina, 2012), y desarrollo de mercados en el marco de los tratados de libre comercio (TLC). Por lo cual desarrollar investigaciones orientadas a la comprensión de sus características y a buscar soluciones a los problemas presentados por el cultivo es de vital relevancia.

En el departamento de Sucre las especies más cultivadas son el ñame "Espino" (*Dioscorea rotundata*) y el ñame "Criollo" (*Dioscorea alata*), con un 75% de la cantidad total cultivada (Reina, 2012). En esta zona del país el ñame se produce de forma vegetativa mediante el fraccionamiento de los tubérculos, ocasionando, en algunos casos, la transferencia de enfermedades de un ciclo a otro y de una localidad a otra. (Rodríguez, et al., 2008). Por ello surgió la iniciativa de implementar nuevas metodologías para la conservación de estas especies, tal como el cultivo *in vitro*. A través de esta metodología la Universidad de Sucre estableció un banco de germoplasma en el cual se resguardan las especies anteriormente mencionadas.

La conservación de este cultivo en un banco de germoplasma constituye la solución a los problemas presentados por el cultivo en campo. Existen reportes sobre micropropagación de algunos ñames comestibles como *D. rotundata* cv. "Espino" (Acosta y Beltrán, 2001); *D. alata* cv "Pico de Botella" (Rodríguez y Beltrán, 2001); embriogénesis somática en *D. alata* cv "Diamante 22" (Espitia y Quintero, 1999) (citados en Salazar, 2002). Sin embargo, el cultivo *in vitro* de *Dioscorea* spp presenta desventajas tales como períodos cortos entre subcultivos (3 a 4 meses), que traen como consecuencia el aumento de costos y uso de mano de obra, afectando la estabilidad genética de las accesiones y comprometiendo la asepsia de las mismas (Acedo y Arradoza, 2006).

En este sentido fue necesario aplicar un nuevo método de conservación que permitiera extender los periodos de subcultivo y así evitar la pérdida del material, el aumento de costos y mano de obra. Este método es denominado conservación bajo crecimiento mínimo, con el cual se logra restringir de forma directa el crecimiento y desarrollo de una planta mediante el estrés osmótico controlado que generan algunos componentes del medio de cultivo, tales como los azúcares y azúcares de alcohol en combinación con parámetros ambientales controlados (Neiva y Jiménez, 2010). Existen reportes de conservación en *Dioscorea*, spp como "*Dioscorea alata* L, clon "Cara-

queño" (Borges et al., 2009), en este estudio lograron conservar y regenerar plantas *in vitro* a partir de segmentos uninodales de *D. alata* L clon caraqueño durante 9 y 12 meses, con diferentes concentraciones de manitol, sacarosa y BAP, también se han realizado estudios en otras especies como "*Dioscorea alata*, *D. rotundata*, *D. bulbifera* y *D. trifida*" (Carmona, et al., 2013), lograron conservar cuatro especies *in vitro* de ñame a partir de la combinación de sacarosa, manitol y sorbitol por un periodo superior a seis meses. Estos métodos han sido exitosos, sin embargo en esta última investigación las especies respondieron de forma distinta a los diferentes tratamientos, de tal manera que cada especie tenía un medio en el cual se mantuvo bajo las condiciones de conservación adecuadas durante la investigación.

Por las razones anteriormente expuestas este trabajo tuvo como objetivo establecer medios de cultivo óptimos para la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de diferentes accesiones pertenecientes al Banco de Germoplasma de ñame de la Universidad de Sucre. Esto durante un periodo de 8 meses y con base en la modificación del medio de cultivo con distintos niveles de manitol y sorbitol de forma individual y combinada.

Materiales y métodos

Ubicación geográfica

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja. Esta se ubica en la ciudad de Sincelejo, cuya posición geográfica en Colombia es 9° 18' de latitud norte y 75° 23' de longitud oeste del meridiano de Greenwich. Ortega et al. (2011).

Técnicas y procedimientos generales

Obtención del material vegetal

Se prepararon medios de micropropagación para el establecimiento de las plantas madre. Estos consistieron en sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), sacarosa 30 g/L, carbón activado 2 g/L, ANA 0,5 mg/L, BAP 4 mg/L, tiamina 1mg/L, mioinositol 0,1g/L, agar 8 g/L, para *Dioscorea alata*. Para *Dioscorea rotundata* se prepararon medios con las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), sacarosa 30 g/L, carbón activado 2 g/L, ANA 0,1 mg/L, BAP 0,3 mg/L, tiamina 1 mg/L, mioinositol 0,1g/L, y agar 3,25 g/L.

El pH del medio de cultivo se ajustó a 5,8 y se distribuyó en frascos de 182 cm³, a razón de 20 ml por frasco. Finalmente se esterilizó por 20 min. a 15 psi y 121 °C. Los medios se observaron 7 días, antes de su uso, para descartar contaminación preliminar.

Se sembraron 3 segmentos por frasco, provistos de nudos y hojas de plantas donantes del banco de germoplasma del laboratorio de biotecnología vegetal de la Universidad de Sucre. Las actividades de preparación de equipos, esterilización de materiales y medios de cultivo, se desarrollaron bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar horizontal (Astrocel®), en condiciones controladas de temperatura e iluminación.

Siembra de los explantes y condiciones del cultivo

Se emplearon segmentos uninodales (desprovistos de hojas y raíces) con una longitud aproximada de 1 cm, los cuales se obtuvieron a partir de las plantas madre micropropagadas, a los 3 meses de su establecimiento. Los segmentos se sembraron obedeciendo a la polaridad de la planta a razón de un explante por frasco bajo cabina de flujo laminar horizontal en condiciones asépticas. Finalmente se colocaron en un cuarto de incubación a una temperatura de 28 ± 5 °C, humedad relativa de 65 % y un fotoperiodo de 12 horas luz con una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Conservación in vitro

Medios de cultivo

Estuvieron compuestos por las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), carbón activado 1g/L, ANA 0,5 mg/L, BAP 4 mg/L, tiamina 1mg/L, mioinositol 0,1g/L, agar 8 g/L, para *Dioscorea alata*. Para *Dioscorea rotundata* se prepararon medios con las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962), carbón activado 1g/L, ANA 0.1 mg/L, BAP 0.3 mg/L, tiamina 1.0 mg/L, mioinositol 0.1g/L, y agar 8g/L. El medio se modificó con distintas concentraciones de sacarosa (%), manitol (%) y sorbitol (%) de forma individual y combinada. Conformando los siguientes tratamientos: T1 (3:0:0); T2 (0:1,5:0); T3 (0:0:2); T4 (0:1,5:2); T5 (0:0:1); T6 (0:0:3); T7 (0:1,5:1); y T8 (0:1,5:3). Se ajustó el pH del medio de cultivo a 5,8, luego se disolvió el agar durante 10 min. en una plancha de calentamiento y se distribuyó en frascos de 182 cm³, a razón de 20 ml por frasco. Finalmente se esterilizó en autoclave (Sterilof®), durante 20 min a 15 Psi y 121 °C de temperatura. Los medios se mantuvieron durante 7 días (máximo), antes de su uso para descartar cualquier contaminación de los mismos. Los medios de los diferentes tratamientos se sembraron en condiciones de asepsia en cabina de flujo laminar horizontal (Astrocel®).

Evaluación de la conservación

Se evaluaron cada 30 días, y en un periodo de 8 meses las siguientes variables.

- Longitud del tallo (se midió en centímetros con una regla milimetrada, desde la base del explante hasta el último nudo).

- Longitud de la raíz más larga. (cm).
- Número de nudos por explante.
- Número de raíces.
- porcentaje de hojas verdes expandidas (número de hojas expandidas/número de hojas totales).
- Porcentaje de hojas muertas (número de hojas muertas/número de hojas totales).
- Porcentaje de callo. (número de plantas *in vitro* que generaron callo/ número de plantas totales)
- Porcentaje de oxidación. (número de plantas *in vitro* con oscurecimiento en el tejido/ número de plantas totales). Se evaluó por observación visual.
- Porcentaje de Supervivencia. (número de plantas *in vitro* vivas/ número de plantas totales), Estrada et al. (2009).

Diseño y análisis estadístico

Esta investigación se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA), formado por 8 tratamientos, con 3 repeticiones y 8 réplicas. A los datos obtenidos se les aplicaron las pruebas de normalidad (ShapiroWilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett), tras lo cual, aquellas variables distribuidas de forma normal y homogénea fueron sometidas a un análisis de varianza (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiples de medias Tukey (α : 0.05), mientras que en caso contrario se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Todos los análisis estadísticos se procesaron en el programa R para Windows. (De Mendiburu, 2012).

Resultados y discusión

Experimento 1: Efecto del manitol y sorbitol en la conservación in vitro de *Dioscorea alata*.

Los resultados obtenidos en la presente investigación permiten afirmar que el uso de los diferentes agentes osmóticos afecta la supervivencia *in vitro* de la especie *D. alata*. En este sentido, no es aconsejable el uso individual de manitol en el medio de cultivo de esta especie ya que ocasiona la muerte de todos los explantes. Posiblemente esto se deba a una baja disponibilidad de nutrientes y de carbono, debido a la poca absorción de agua por parte de la planta por la reducción del potencial hídrico del medio de cultivo, producto de la adición de dicho osmorregulador. Este fenómeno ha sido observado por Cárdenas y Villegas (2002), quienes encontraron que el uso de manitol como osmorregulador genera potenciales osmóticos más negativos en comparación al sorbitol (tabla 1).

Tabla 1. Porcentajes de supervivencia, hojas expandidas, muertas, callo y oxidación en *Dioscorea alata* a los 8 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Supervivencia (%)	Hojas expandidas (%)	Hojas muertas (%)	Callo (%)	Oxidación (%)
T ₁	91,07 ab	85,25 ab	5,98 abc	0,00	0,00
T ₂	0,00 c	-	-	-	-
T ₃	90,48 ab	72,06 b*	15,98 a	0,00	0,00
T ₄	100,00 a*	95,83 a	0,35 c*	0,00	0,00
T ₅	75,00 b	85,43 ab	11,65 a	0,00	0,00
T ₆	100,00 a*	88,00 ab	6,91 ab	0,00	0,00
T ₇	62,50 bc	83,47 b*	3,08 bc	0,00	0,00
T ₈	76,19 bc	82,34 b*	4,52 abc	0,00	0,00
TEST	Kruskal	Kruskal	Kruskal	No aplica	No aplica

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para $p < 0,05$, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro* y (-) valor ausente debido a la muerte de los explantes.

T1: Sacarosa 3%	T2: Manitol 1,5%	T3: Sorbitol 2%
T4: Manitol 1,5% + Sorbitol 2%	T5: Sorbitol 1%	T6: Sorbitol 3%
T7: Manitol 1,5% + Sorbitol 1%	T8: Manitol 1,5% + Sorbitol 3%	

Por otra parte, el uso de sorbitol (3%) o la combinación manitol-sorbitol (1,5-2%), permiten alcanzar las mayores tasas de supervivencia, por lo cual es posible asegurar la disponibilidad de este cultivo a quien lo necesite. La explicación a este fenómeno está asociada a la capacidad del sorbitol de generar un estrés osmótico menos severo que otros osmorreguladores y a su utilidad como fuente de energía para los explantes (tabla 1).

Al evaluar el porcentaje de hojas expandidas, se encontró que esta variable responde de forma diferente a los tratamientos empleados, siendo T₃, T₇ y T₈, quienes obtuvieron los menores valores. Asimismo, también se observaron diferencias en cuanto al tamaño de las hojas, siendo las generadas por los medios de cultivo con sacarosa y sorbitol de mayor tamaño que las obtenidas cuando se empleó manitol, probablemente esto se deba a la falta de nutrientes para el desarrollo de estas estructuras (tabla 1).

Con respecto a la senescencia foliar, el uso de la combinación manitol-sorbitol (1,5-2%), resulta ser la más apropiada, ya que la aparición de tejido foliar muerto es casi nula, debido posiblemente al desarrollo limitado que tienen los explantes creciendo en estas condiciones. Adicionalmente, se debe tener en cuenta el efecto potenciador del sorbitol sobre la necrosis del tejido foliar, especialmente cuando se usa individual-

mente. Resultados similares fueron obtenidos por Carmona, *et al.* (2013), quienes encontraron que el uso de la combinación manitol-sorbitol, previene la senescencia foliar en las plantas *in vitro* de *Dioscorea alata*.

Por otro lado, en la presente investigación se encontró que el uso de diferentes osmorreguladores no promueve la oxidación, tampoco la aparición de tejido celular desorganizado (callo) en el explante (tabla 1).

Tal como lo muestra la tabla 2, la longitud del tallo varía dependiendo de la fuente de carbono utilizada, siendo los tratamientos T₇ y T₈ los que presentan el menor desarrollo, en este sentido se evidencia el efecto de la interacción entre el manitol y sorbitol, la cual provoca una reducción considerable en el desarrollo del explante, dando lugar a plantas "enanas", caracterizadas por poseer tallos y hojas pequeñas, así como nudos muy cerca unos de otros. Este fenómeno es el resultado de la interacción del genotipo de la planta con un azúcar inerte como lo es el manitol en conjunto con un azúcar medianamente metabolizable como lo es el sorbitol. Estos resultados no coinciden con los obtenidos por Borges *et al.*, (2009), quien encontró que el uso de manitol no afecta de forma significativa la longitud del tallo durante la conservación *in vitro* de la especie *Dioscorea alata* clon caraqueño.

Tabla 2. Longitud del tallo, número de raíces, longitud de raíz y número de nudos en *Dioscorea alata* a los 8 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Longitud tallo (cm)	Número raíces	Longitud raíz (cm)	Número nudos
T ₁	2,46 a	4,94 bc	6,86 a	8,24
T ₃	1,64 a	5,47 abc	3,89 b	7,52
T ₄	0,94 bc	8,63 a	3,73 b	7,78
T ₅	1,12 b	3,60 c*	3,87 b	5,78
T ₆	2,53 a	5,23 abc	5,06 ab	7,63
T ₇	0,78 c*	7,78 ab	1,45 c*	5,78
T ₈	0,75 c*	8,48 ab	1,36 c*	6,54
TEST	Kruskal	Tukey	Tukey	Tukey

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para $p < 0,05$, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T ₁ : Sacarosa 3%	T ₃ : Sorbitol 2%	T ₄ : Manitol 1,5% + Sorbitol 2%
T ₅ : Sorbitol 1%	T ₆ : Sorbitol 3%	T ₇ : Manitol 1,5% + Sorbitol 1%
T ₈ : Manitol 1,5% + Sorbitol 3%		

Asimismo, el número de raíces en esta especie varía dependiendo del osmorregulador utilizado, siendo el uso de sorbitol a bajas concentraciones quien provoca el menor desarrollo de esta variable, lo cual es aconsejable para la conservación *in vitro*, ya que permite restringir la absorción de nutrientes por parte del explante. No obstante, al emplear concentraciones de sorbitol por encima del 1%, en forma individual o combinada, se produce un gran número de raíces.

En este sentido, aunque el uso de sorbitol en conjunto con manitol, genera el mayor número de raíces, estas se caracterizan por ser de tamaño pequeño, posiblemente porque la planta necesita aumentar la cantidad de estructuras encargadas de absorber los nutrientes

del medio, para suplir las necesidades de su metabolismo, de esta manera, los explantes en estos tratamientos “prefieren” incrementar el número de raíces aunque su tamaño sea muy reducido.

Por otra parte, los resultados encontrados muestran que el uso de diferentes fuentes de carbono no afecta la formación de nudos en la especie *Dioscorea alata*, a los 8 meses de conservación *in vitro*. Estos resultados coinciden con los encontrados por Borges *et al.*, (2009).

Con base a lo anteriormente expuesto, es posible afirmar que la especie *Dioscorea alata* responde de forma más adecuada al tratamiento T₄, es decir, que el uso

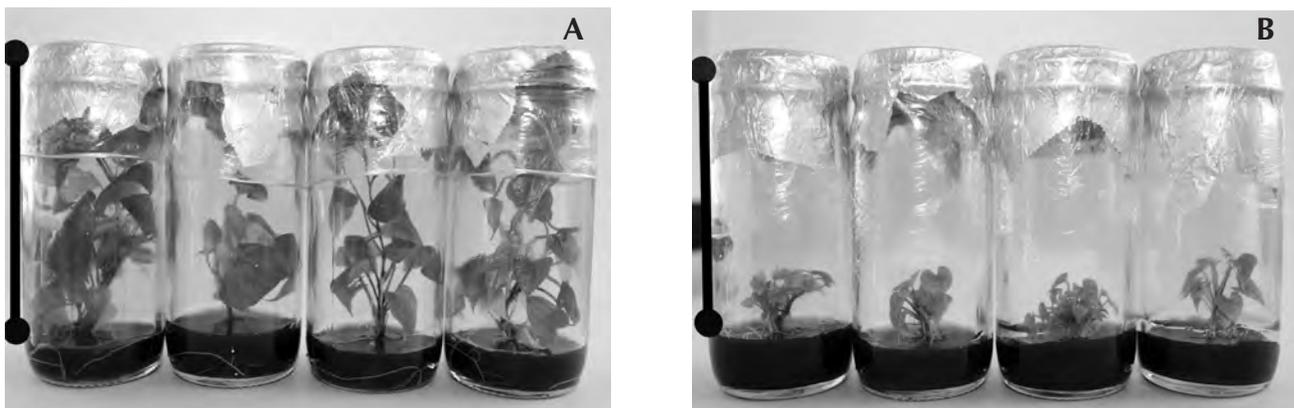


Figura 1. Aspecto de las plantas de *Dioscorea alata* a los 8 meses de conservación *in vitro*. a) plantas en medio de sacarosa 3% (barra= 8,5cm). b) plantas en medio de manitol-sorbitol (1,5-2%) (barra= 8,5cm).

combinado en el medio de cultivo de manitol-sorbitol permite la conservación *in vitro* de esta especie durante 8 meses, ya que este tratamiento posee la mayor tasa de supervivencia y el menor porcentaje de senescencia foliar, además de presentar un desarrollo restringido en el resto de sus variables (figura 1).

Experimento 2: Efecto del manitol y sorbitol en la conservación *in vitro* de *Dioscorea rotundata*

Los resultados encontrados en este ensayo muestran que la tasa de supervivencia en la especie *Dioscorea rotundata* se ve afectada por el uso de diferentes osmorreguladores, siendo los tratamientos T₁, T₃, T₄ y T₇, quienes presentan los mayores valores y por tanto son considerados adecuados para la conservación *in vitro* de esta especie. Además, se debe tener en cuenta que el uso individual de manitol en el medio de cultivo resulta ser inadecuado, ya que en estas condiciones la tasa de supervivencia es demasiado baja. Estos resultados no coinciden con los reportados por Carmona et al. (2013), quien encontró que la tasa de supervivencia de la especie *Dioscorea rotundata* no se ve afectada por el uso de diferentes reguladores osmóticos, especialmente al emplear manitol. Una posible explicación a este fenómeno puede estar relacionada con el geno-

tipo del material vegetal empleado, ya que pertenecen a cultivares diferentes.

Por otro lado, los resultados obtenidos evidencian que el porcentaje de hojas expandidas y muertas también varía con relación al tipo de fuente de carbono utilizada, en este sentido el uso de la combinación manitol-sorbitol genera valores reducidos de esta variable, evidenciando así un retraso en el crecimiento y desarrollo de los explantes.

Asimismo, la evaluación de la senescencia foliar en las plantas indico que las combinaciones manitol-sorbitol, son adecuadas para la conservación *in vitro*, siempre y cuando no se utilicen altas concentraciones de sorbitol (superiores al 2%), ya que en ambos ensayos la presencia de sorbitol suele estar asociada a altos porcentajes de senescencia foliar. Resultados similares fueron encontrados por Carmona et al. (2013).

Con respecto a los porcentajes de oxidación y callo, se encontraron resultados similares a los presentados por *Dioscorea alata*, es decir, no se evidencio un efecto significativo en la aparición de estas características al emplear diferentes fuentes de carbono.

Los resultados obtenidos muestran que la reducción en el crecimiento del tallo puede lograrse mediante el uso de la combinación manitol-sorbitol, o la apli-

Tabla 3. Porcentajes de supervivencia, hojas expandidas, muertas, callo y oxidación en *Dioscorea rotundata* a los 8 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Supervivencia (%)	Hojas expandidas (%)	Hojas muertas (%)	Callo (%)	Oxidación (%)
T ₁	100,00 a*	94,95 ab	1,39 bc*	4,17	0,00
T ₂	33,33 c	83,83 abc	0,00 c	0,00	0,00
T ₃	100,00 a*	93,70 ab	1,53 bc*	0,00	0,00
T ₄	100,00 a*	75,70 bc	1,04 bc*	0,00	0,00
T ₅	86,31 b	8,06 a	0,40 bc*	0,00	0,00
T ₆	91,67 ab	79,50 bc	6,14 a	0,00	0,00
T ₇	100,00 a*	69,53 c*	2,49 ab	0,00	0,00
T ₈	95,83 ab	72,60 c*	0,55 bc*	0,00	0,00
TEST	Kruskal	Kruskal	Kruskal	Kruskal	No aplica

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para $p < 0,05$, Donde (*) atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T ₁ : Sacarosa 3%	T ₂ : Manitol 1,5%	T ₃ : Sorbitol 2%
T ₄ : Manitol 1,5% + Sorbitol 2%	T ₅ : Sorbitol 1%	T ₆ : Sorbitol 3%
T ₇ : Manitol 1,5% + Sorbitol 1%	T ₈ : Manitol 1,5% + Sorbitol 3%	

Tabla 4. Longitud del tallo, número de raíces, longitud de raíz y número de nudos en *Dioscorea rotundata* a los 8 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Longitud tallo (cm)	Número raíces	Longitud raíz (cm)	Número nudos
T ₁	2,15 a	5,37 a	6,40 a	5,75
T ₃	1,17 ab*	1,67 bc	1,48 c	4,51
T ₄	1,24 ab*	1,45 cd*	1,39 c	5,49
T ₅	2,17 a	2,37 ab	2,40 ab	5,96
T ₆	1,84 ab*	2,26 ab	2,28 b	6,36
T ₇	1,17 ab*	1,33 cd*	0,70 d*	4,65
T ₈	1,10 ab*	1,92 bc	1,69 c	5,24
TEST	Tukey	Kruskal	Kruskal	Tukey

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para $p < 0,05$, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T ₁ : Sacarosa 3%	T ₂ : Manitol 1,5%	T ₃ : Sorbitol 2%
T ₄ : Manitol 1,5% + Sorbitol 2%	T ₅ : Sorbitol 1%	T ₆ : Sorbitol 3%
T ₇ : Manitol 1,5% + Sorbitol 1%	T ₈ : Manitol 1,5% + Sorbitol 3%	

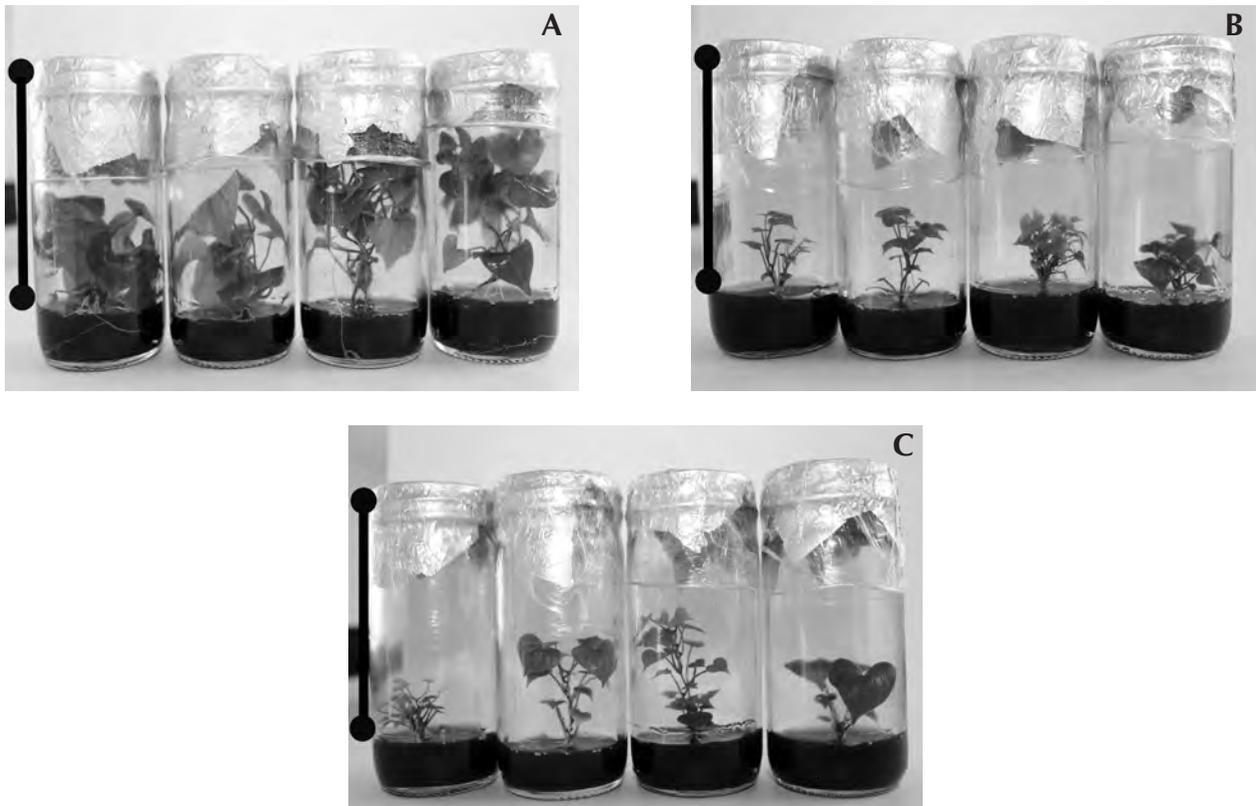


Figura 2. Aspecto de las plantas de *Dioscorea rotundata* a los 8 meses de conservación *in vitro*. a) plantas en medio de sacarosa 3% (barra= 8,5cm). b) plantas en medio de manitol-sorbitol (1,5-2%) (barra= 8,5cm). c) plantas en medio de manitol-sorbitol (1,5-1%) (barra= 8,5cm).

cación de sorbitol en concentraciones superiores al 1%, asimismo es posible alcanzar una reducción considerable en la formación y elongación de raíces mediante el uso de dicha combinación, por tanto, estas condiciones son aconsejables para la conservación *in vitro* de esta especie, es decir, los tratamientos T₄ y T₇. Adicionalmente, los resultados indicaron que no existe un efecto significativo en la formación de nudos en la plantas *in vitro* al emplear diferentes osmorreguladores en el medio de cultivo.

Finalmente, al tener en cuenta los planteamientos anteriormente mencionados es posible afirmar que los tratamientos T₇ y T₄, son los más adecuados para la conservación *in vitro* de la especie *Dioscorea rotundata*, ya que permiten reducir significativamente su crecimiento y desarrollo en cuanto a las variables de longitud de tallo y raíz, así como también en el número de raíces, manteniendo tasas altas de supervivencia y un porcentaje mínimo de senescencia foliar (figura 2).

Conclusión

Finalmente podemos concluir que el medio compuesto por sales (MS) + manitol 15 g/L + sorbitol 20 g/L + carbón activado 2 g/L + tiamina 1mg/L + mioinositol 0,1g/L + agar 8 g/L permiten de manera efectiva la conservación de plantas *in vitro* a partir de segmentos uninodales de *Dioscorea alata* suplementados con 4 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de ANA y *Dioscorea rotundata* suplementado con 0.3 mg/L de BAP y 0.1 mg/L de ANA, durante 8 meses con altos porcentajes de supervivencia, bajos porcentajes de senescencia foliar, evidenciando un desarrollo restringido en plantas *in vitro*.

Agradecimientos

Esta investigación fue realizada satisfactoriamente gracias al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre y el apoyo otorgado por el programa de Joven Investigador e Innovador de Colciencias No. 566 del año 2012.

Referencias bibliográficas

- Acedo, V.Z. y Arradoza, C. (2006). Development of *in vitro* slow growth culture for yam (*Dioscorea alata* L.). PCARRD, 30(1), 1 p.
- Borges, M., Alarcón, Y., Malaurie, B., Hernández, Y. y Silva, J. (2009). Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (*Dioscoreaceae*). *Revista Peruana de Biología*, 16(2), 203-208.
- Cárdenas, M. y Villegas, A. (2002). Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 25(2), 213-217.
- Carmona, O., Díaz, L. y Beltrán, J. (2013). Efecto de los osmolitos sacarosa, manitol y sorbitol en la conservación *in vitro* de *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida* por el método de crecimiento mínimo. *Revista Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, (25), 1-519.
- De Mendiburu, F. (2012). Manual rápido de uso de la librería agrícola. Universidad Nacional Agraria La Molina. 60 p.
- Estrada, E., Borges, M., González, L., Hernández Y., Kosky, R. y Malaurie, B. (2009). Aplicación de algunas técnicas de estadística multivariada al estudio de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata* L. *Revista de Biotecnología Vegetal*, 9(3), 153-159.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. Citado por Borges García, M. et al., (2009). Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. 203-208.
- Neiva, C. y Jiménez, V. (2010). Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*. 21(1), 193-205.
- Reina, Y. C. (2012). El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Documentos de trabajo sobre economía regional. *Banco de la Republica sucursal Cartagena*. 1(168), 31. ISSN 1692-3715.
- Rodríguez, M., Matehus J., Gerstl A. y Santana M. (2008). Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.). *Interciencia*. 33(7), 1-11.
- Ortega, R., Beltrán, J., y Marrugo, J. (2011). Acumulación de mercurio (Hg) por caña flecha (*Cynerium sagittatum*) (Aubl) Beauv. *in vitro*. *Revista Colombiana De Biotecnología*, 13(1), 33-41. Recuperado de: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/22923/38225>.
- Salazar, R. y Beltrán, J. (2002). Microtuberización en Ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(2), 27-32.
- Thurston, D. (1998). Tropical plant diseases. APS-Press. Segunda edición. p 79-82.