

CAPÍTULO 2

MICROPROPAGACIÓN DE ÑAME ESPINO (*Dioscorea rotundata*, POIR), CULTIVAR BOTÓN EN SISTEMA DE CULTIVO DOBLE FASE

Lucía Candelaria Díaz Narváez²
Heberto Polanco Ortega³
Oscar Elías Carmona Wilches⁴
Eder Dadner Durango Ballesteros⁵
Javier Darío Beltrán Herrera⁶
Isidro Elías Suárez Padrón⁷

2 Biólogo. Maestría en Biotecnología.

3 Biólogo. Maestría en Biotecnología.

4 Biólogo. Maestría en Biotecnología.

5 Ingeniero Agrónomo, Maestría en Biotecnología. Doctorado en Biotecnología Agrícola, mención Vegetal. Instructor Investigador en el SENA Programa SENNOVA

6 Biólogo, Maestría en Biología Molecular de Plantas Tropicales y Doctorado en Fitopatología. Profesor de la Universidad de Sucre.

7 Ingeniero Agrónomo, Doctor en Ciencias Hortícolas. Docente Universidad de Córdoba

Introducción

El ñame espino (*Dioscorea rotundata*) es una de las 650 especies pertenecientes al género *Dioscorea*, ampliamente distribuidas en regiones tropicales de alta pluviosidad, donde exhibe su mayor diversidad, consolidándose como el grupo principal de plantas con flores de esta familia (Thurston, 1998). Es originario de África occidental y actualmente distribuido por todos los trópicos. Esta especie no se conoce en estado silvestre y se cree que derivó de *D. cayenensis*, de la misma región. Las plantas pertenecientes a esta especie se caracterizan por poseer tubérculos llamados ñames, los cuales son una estructura del tallo modificado, cuya función es el almacenamiento de gránulos de almidón (Tejeda et al., 2007).

En Colombia, las especies más cultivadas son *Dioscorea alata* o ñame criollo y *D. rotundata* o ñame espino, donde el 92% de la producción nacional se concentra en los departamentos de Sucre, Córdoba y Bolívar (Campo, 2011; Reina, 2012; Agronet, 2016). El ñame espino, por su parte, es un cultivo de pequeños y medianos agricultores de la Costa Caribe, el cual constituye la principal fuente de ingresos, de empleo rural, oferta de alimento para sus pobladores y un producto de exportación (Tejeda et al., 2007; Reina, 2012).

El departamento de Sucre genera el 20% de la producción de ñame de la Costa Caribe, ocupando el tercer lugar después de Bolívar y Córdoba (Agronet, 2014). En este departamento el ñame es el principal producto de la canasta familiar y sustento de pequeños productores, donde el 47% de la producción total es de ñame espino (Reina, 2012). En el 2010 se reportó en Sucre una producción de 13.020 toneladas (ton) de ñame espino, siendo Los Palmitos el principal municipio productor (4.680 ton), seguido de Ovejas (4.560 ton), Sampués (1.000 ton), Tolúviejo y Sincé (337 ton), en total para el 2010 se cultivaron 1.269 hectáreas (ha) y se cosecharon 1.260 ha en todo el departamento. Es importante resaltar que el municipio de Los palmitos registra rendimientos por hectáreas del cultivo entre 14 y

18 ton, y algunos productores han incrementado su densidad de siembra hasta 15.000 plantas ha⁻¹ alcanzando un rendimiento de hasta 26 ton (Fundación Procaribe, 2012).

Adicionalmente, el cultivo de ñame espino (*Dioscorea rotundata*) se ha posicionado como un producto de exportación en los mercados de Estados Unidos y Europa generándole al país más de US\$2.5 millones anuales (Sánchez y Hernández, 2003; Fundación Procaribe, 2012; Plan General de Asistencia Técnica Municipio de Chalán, (2013) siendo a nivel nacional la especie que más genera ingresos de exportación (40 millones de pesos por cada contenedor de 22, 8 ton) (ICA, 2009).

No obstante, el desarrollo extensivo de este cultivo se ha visto limitado, principalmente por dos razones: (i) bajas tasas de multiplicación en campo del material vegetal de plantación (tubérculo), y (ii) alta susceptibilidad del cultivo frente a enfermedades causadas por virus, bacterias, nematodos y en especial hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Salazar y Beltrán, 2002; Reina, 2012). Además, el riesgo de transmisión de enfermedades de un ciclo a otro y de una localidad a otra se incrementa debido a la propagación vegetativa del cultivo a través del fraccionamiento de los tubérculos (Amusa, Adegbite, Muhammed y Baiyewu, 2003). A esto, se suma la estacionalidad del cultivo, cuya siembra normalmente inicia entre abril y mayo (Rodríguez, 2015; Fundación Procaribe, 2012), originando escases de material de siembra e incrementa sus costos durante ese período. En ese sentido, para el cultivo de ñame, la poca disponibilidad de material de siembra se presenta como la principal problemática a solucionar hacia un desarrollo eficiente del cultivo del ñame (Yan et al., 2011).

Es así como la propagación *in vitro* surge como una excelente alternativa, pues permite la producción de plantas genéticamente homogéneas, la utilización de propágulos de pequeño tamaño, independencia de la estacionalidad, sanidad del material vegetal y manipulación de una tasa elevada de explantes en espacio reducido (Vidoy, 2014). Sin embargo, la micropropagación por segmentos nodales más extendida en especies vegetales, especialmente en plantas del género *Dioscorea* se realiza en matrices de cultivo semisólido (SS) (Borges et al., 2011; Bonilla y Hernández, 2012; Senapati et al., 2015). Además, los protocolos para la propagación *in vitro* de ñame bajo matrices (SS) han presentado bajos coeficientes de

multiplicación y supervivencia de las plantas en la fase de aclimatación y en campo (Medero et al., 1999; Chu y Figueredo, 2002; Borges et al., 2004).

Una alternativa para obtener una mayor eficiencia en la propagación in vitro, y a su vez disminuir los costos de producción y mano de obra, se ha desarrollado en diferentes especies vegetales, donde implementan un sistema de cultivo doble fase (DF), el cual consiste en una capa de medio semisólido superpuesta por una capa de medio líquido, que le brinda soporte al explante previniendo problemas como la hiperhidricidad (Ziv, 1995; Domingues et al., 2013; Senapati, 2015), y a su vez brinda las ventajas del medio líquido tales como; mayor disponibilidad de agua y nutrientes, reducción en los gradientes de nutrientes y hormonas endógenas, eliminación de la polaridad y reducción en el efecto de las toxinas (Singha 1982, citado por Ávila et al., 1996; Debergh, 1983; Gawel y Robacker 1990; Ascough y Fennell, 2004). Se debe considerar que la micropropagación de especies vegetales en sistema de cultivo (DF) no requiere la realización de subcultivos periódicos, con lo cual es posible reducir los riesgos de contaminación por manipulación y los costos de producción debido a la reducción en insumos y mano de obra (Senapati, 2015), razones por la cual esta investigación tuvo como objetivo desarrollar un protocolo de micropropagación para la especie *D. rotundata* cultivar Botón en sistema de cultivo (DF) para la producción de material de siembra de excelente calidad fisiológica y fitosanitaria del cultivo.

Metodología

Ubicación Geográfica: esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad de Sucre, sede Puerta Roja en la ciudad de Sincelejo.

Obtención del Material Vegetal: las plántulas necesarias para el desarrollo de esta investigación fueron obtenidas a través de subcultivos periódicos cada tres meses de la accesión codificada como 010 (*D. rotundata*, cultivar Botón) perteneciente al Banco de Germoplasma de Ñame de la Universidad de Sucre. Como explante se utilizaron segmentos con al menos dos nudos, con hojas y sin raíces, a razón de tres explantes por frasco (182 cm³).

Micropropagación de ñame espino (*dioscorea rotundata*, poir), cultivar botón en sistema de cultivo doble fase

El medio de cultivo estuvo constituido por sales Murashige y Skoog al $4,33 \text{ g L}^{-1}$, sacarosa 30 g L^{-1} , tiamina 1 mg L^{-1} , mioinositol $0,1 \text{ g L}^{-1}$, y agar $5,5 \text{ g L}^{-1}$. Todos los medios de cultivo se ajustaron a un pH de 5.8 ± 0.1 y fueron esterilizados por 20 minutos a 15 psi y 121°C , tras lo cual fueron observados durante 7 días, antes de su uso, para descartar cualquier contaminación. La incubación de las plántulas se realizó a una temperatura $25 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad relativa de 65% y un fotoperiodo de 12 horas luz con una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Comparación del desarrollo in vitro de la especie D. rotundata, cv. Botón en el sistema de cultivo convencional y doble fase a través del tiempo.

En este experimento se utilizaron segmentos uninodales con una longitud aproximada de 1,5 cm, tomados de plantas de 60 días de edad micropropagadas sin la implementación de reguladores de crecimiento e incubadas bajo las condiciones descritas anteriormente. El material vegetal se estableció en medios de cultivo, a razón de un segmento nodal por recipiente (240 cm^3).

En cada uno de los recipientes se depositaron 30 ml de medio de cultivo. El cual estuvo constituido por sales MS $4,33 \text{ g L}^{-1}$, sacarosa 30 g L^{-1} , tiamina 1 mg L^{-1} , mio-inositol 100 mg L^{-1} , ANA $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, BAP $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ y agar $6,0 \text{ g L}^{-1}$. Además, Para el sistema de cultivo doble fase se adicionaron 10 ml de medio de cultivo líquido con la misma formulación que el medio de cultivo semisólido, tres días después del establecimiento de los explantes.

Los segmentos uninodales estuvieron provistos de una hoja y sin raíces. Los cuales, fueron establecidos en los distintos sistemas a razón de un explante por recipiente obedeciendo a la polaridad de la planta, las cuales fueron incubadas a una temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, humedad relativa de 65%, una intensidad lumínica de $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 12 horas luz.

Además, las plántulas de D. rotundata, cultivar Botón, incubadas en los dos sistemas de cultivo bajo las condiciones anteriormente mencionadas, fueron trasplantadas a condiciones de casa malla al cabo de 30, 60 y 90 días

en bandejas plásticas con 18 alveolos con un sustrato comercial (Ergo®), en cada uno de los cuales, se transfirió una plántula por alvéolo.

Bajo condiciones de casa malla se empleó un polisombra del 60% de cobertura y una frecuencia de riego por nebulización de 30 segundos cada media hora. Después de la primera semana las plantas se irrigaron con una frecuencia de 12 segundos cada dos horas, y a partir de la cuarta semana las plantas fueron sometidas a una frecuencia de dos riegos diarios de 3 minutos cada uno, cada 12 horas (Suárez et al., 2009).

Evaluación del desarrollo in vitro de la especie *D. rotundata*, cv. Botón en el sistema de cultivo convencional y doble fase a través del tiempo.

A los 30, 60 y 90 días de haber iniciado el experimento de multiplicación en ambos sistemas de cultivo, se midieron las siguientes variables:

- Longitud del tallo (en centímetros, desde la base del tallo hasta el último nudo) (Domínguez et al., 2013)
- Número de nudos (Borges et al., 2004)
- Número de hojas (Borges et al., 2011)
- Número de raíces (Scherwinski et al., 2012)
- Densidad estomática (número de estomas por mm²) y número de estomas abiertos.
- Densidad de tricomas (número de tricomas por mm²)

Se realizaron observaciones histológicas de la parte foliar a través de cortes paradérmicos de hojas de *D. rotundata* provenientes de cada sistema de cultivo.

Al final de la sexta semana, se registró el porcentaje de supervivencia (número de plantas vivas sobre el número total de plantas evaluadas por cien) (Díaz et al., 2015).

Diseño y análisis estadístico.

La investigación se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA), formado por seis tratamientos con nueve réplicas cada uno. A los datos obtenidos se les aplicó las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett), tras lo cual, se concluyó que las variables se distribuían de forma normal y homogénea. Por lo tanto, se utilizaron las pruebas paramétricas de Tukey y Tstudent. Todos los análisis estadísticos se procesaron en el programa R para Windows, versión 3.4.3 con los paquetes agricolae y stats (Mendiburu, 2016; R Core Team, 2017).

Comparación del desarrollo in vitro de la especie *D. rotundata*, cultivar Botón en sistema de cultivo convencional y sistema de cultivo doble fase a través del tiempo.

Según Borges et al. (2011), los indicadores fundamentales en la micropropagación de ñame son la longitud del vástago y el número de nudos. El desarrollo de nudos nuevos depende del sistema de cultivo implementado (Tabla1), mostrando resultados superiores en el sistema de cultivo (DF). Asimismo, se evidenció la influencia del tiempo dentro de este sistema, donde se alcanzó el mayor número de nudos (22,44) a los 90 días de cultivo (figura1A), sin embargo, no existen diferencias estadísticas con el valor alcanzado a los 60 días de cultivo (18,22) (Tabla1).

Tabla 1. Efecto del tiempo y el sistema de cultivo sobre la longitud del tallo y el número de nudos de *Dioscorea rotundata*, cv Botón bajo condiciones in vitro.

Tiempo (Días)	Longitud del Tallo		Número de nudos	
	Sistema SS	Sistema DF	Sistema SS	Sistema DF
30	4,02Ab	5,49Ba	5,89Ab	10,22Ba
60	5,60Ab	6,72ABa	8,89Ab	18,22ABa
90	5,14Ab	8,17Aa	8,67Ab	22,44Aa

Letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los tres periodos de tiempo indicados para cada matriz según prueba de comparación de medias Tukey para $p < 0,05$, y letras minúsculas representan diferencias significativas entre sistemas de cultivo para cada periodo de tiempo según prueba de T-Student para $p < 0,05$.

En este sentido, se pudo observar que, independiente del tiempo de cultivo implementado en el sistema semisólido (SS), los resultados fueron estadísticamente no significativos para la variable número de nudos en

los tres periodos de tiempo. Resultados similares fueron obtenidos para la variable longitud del vástago en la cual se obtuvo la mayor longitud del tallo en el sistema de cultivo (DF) a los 90 días de cultivo (8,17 cm) (Figura 1), no existiendo diferencias significativas con la longitud del tallo obtenida a los 60 días de cultivo (6,72 cm). No obstante, en el sistema de cultivo convencional (SS), no hubo diferencias estadísticas para la variable a través del tiempo (figura1B) (Tabla1).

Los resultados anteriores concuerdan con los reportados por Scherwinski et al. (2012), quienes encontraron los valores más altos en las variables longitud del brote y número de nudos de piña (*Ananas comosus* L.) al incubar las plántulas en sistema de cultivo (DF) durante cinco meses. Obteniendo así, una tasa promedio de proliferación de brotes un 58% superior con respecto al sistema de cultivo convencional (SS). Del mismo modo, Senapati (2015) reportó una tasa de multiplicación de brotes (98,7 %) y longitud de brotes (9,9 cm) mayor en sistema de cultivo DF con respecto al sistema de cultivo SS en la propagación in vitro de *Rauwolfia serpentine* L.



Figura 1. Plántulas de *Dioscorea rotundata* Poir. cv. Botón a los 90 días de cultivo. A. Sistema de cultivo doble fase (DF). B. Sistema de cultivo semisólido (SS).

En este orden de ideas, se debe apreciar que el crecimiento de las plántulas tiende a ser mayor en sistemas de cultivo (DF) con relación al

presentado en sistemas de cultivo convencional (SS), lo cual se debe a que en este nuevo sistema se aprovechan las ventajas de las matrices sólidas y líquidas. De esta manera, la utilización de una capa de medio líquido en el sistema de cultivo proporciona las siguientes ventajas: i) incrementa la disponibilidad de agua y nutrientes disueltos en el medio de cultivo (Singha 1982, citado por Ávila et al., 1996; Debergh 1983), ii) reduce los gradientes de nutrientes y hormonas endógenas (Gawel y Robacker 1990), iii) elimina la polaridad, y iv) disminuye el efecto de las toxinas sobre el tejido vegetal (Ascough y Fennell, 2004).

Por otra parte, al emplear una matriz de cultivo sólida en la parte basal del sistema doble fase garantiza: i) soporte al explante, y ii) previene el efecto depresivo sobre el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales debido a la hipoxia (baja disponibilidad de oxígeno) o la hiperhidricidad, las cuales pueden generar desórdenes fisiológicos, como la malformación de hojas y tallos (Ziv, 1995), las cuales se constituyen las principales desventajas de utilizar medio de cultivo líquido para la micropropagación de especies vegetales (Preil, 2005; Ziv, 2005; Cabrera, 2009).

Tabla 2. Efecto del tiempo y el sistema de cultivo sobre el número de raíces y número de hojas de *Dioscorea rotundata*, cv. Botón bajo condiciones in vitro.

Tiempo (Días)	Número de raíces		Número de hojas	
	Sistema SS	Sistema DF	Sistema SS	Sistema DF
30	6,78Ab	9,67Aa	6,78Ab	9,67Aa
60	10,44Aa	9,44Aa	10,44Aa	9,44Aa
90	9,00Ab	13,12Aa	9,00Ab	13,12Aa

Letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los tres periodos de tiempo indicados para cada matriz según prueba de comparación de medias Tukey para $p < 0,05$, y letras minúsculas representan diferencias significativas entre sistemas de cultivo para cada periodo de tiempo según prueba de T-Student para $p < 0,05$.

Con respecto al desarrollo radicular, los resultados evidenciaron la influencia del sistema de cultivo sobre la producción de raíces in vitro en *Dioscorea rotundata*, es así como el número de raíces fue significativamente superior en el sistema de cultivo (DF) en dos de los tres periodos de tiempo 30 y 90 días (tabla 2). Asimismo, a partir de los resultados se pudo constatar que el tiempo de cultivo no tuvo influencia significativa ($p > 0,05$) en el desarrollo radicular dentro de ambos sistemas, no obstante, los resultados

obtenidos en esta investigación no coinciden con los reportados por Senapati (2015), quien encontró que el número de las raíces de *R. serpentine* fue significativamente superior en sistema de cultivo (DF) al compararlo con los resultados obtenidos en sistema de cultivo convencional, demostrando así que el desarrollo radicular de una especie es genotipo dependiente.

Por otra parte, se debe considerar que es posible reducir el tiempo y los costos de producción durante la micropropagación de *D. rotundata*, cv. Botón en sistema de cultivo (DF), puesto que no es necesario realizar una fase de enraizamiento después de la fase de multiplicación, gracias al buen desarrollo radicular de las plántulas.

Resultados similares fueron reportados por Borges et al. (2011) quienes afirmaron que es posible realizar de forma simultánea las fases de multiplicación y enraizamiento en *D. alata*, reduciendo así el tiempo de micropropagación de la especie, los costos asociados a la fase de enraizamiento y la pérdida de plántulas por contaminación. No obstante, los resultados obtenidos en este ensayo superan a los obtenidos en la investigación antes mencionada, para las variables indicadoras de crecimiento y desarrollo.

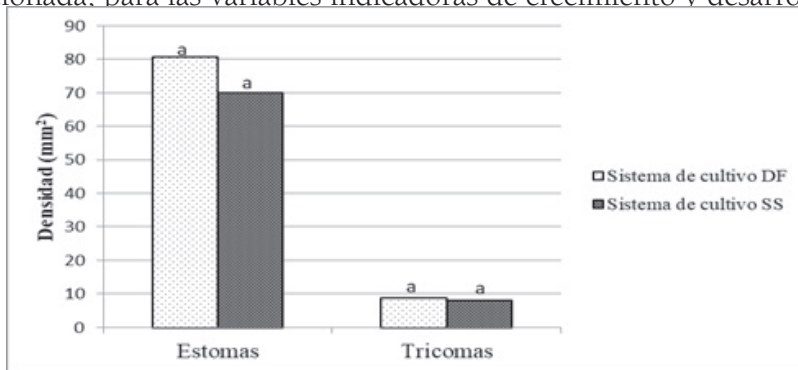


Figura 2. Evaluación *in vitro* de la densidad de tricomas y la densidad estomática de *D. rotundata* cv. Botón en sistema de cultivo doble fase (DF) y sistema de cultivo semisólido (SS).

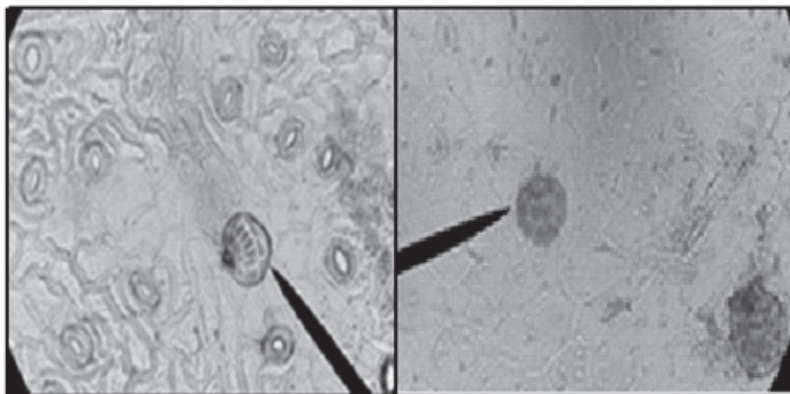


Figura 3. Observación de estomas 40x (A) y tricomas 10x (B) a partir de cortes paradérmicos de hojas de *D. rotundata* cv, Botón en sistema de cultivo doble fase, teñidos con Safranina. (Fuente de elaboración propia) .

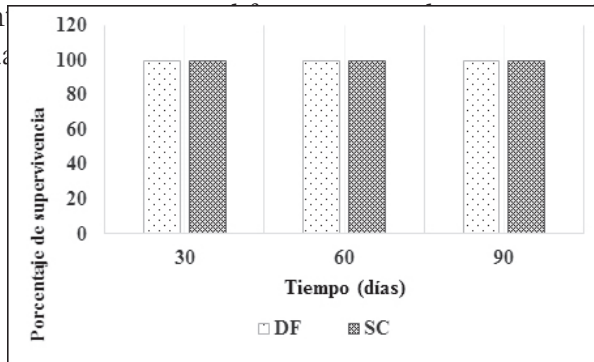
Por otra parte, el desarrollo foliar estuvo influenciado por el sistema de cultivo en el cual se encontraban los explantes, obteniendo un promedio significativamente superior en el número de hojas en el sistema de cultivo doble fase a los 30 y 90 días de incubación. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticas entre los sistemas de cultivo a los 60 días de incubación (tabla 2). Además, se realizaron cortes histológicos (paradérmicos) de las hojas de *D. rotundata*, cultivadas bajo ambos sistemas, y se encontró que la densidad estomática (número de estomas/mm²) fue similar en ambos sistemas (Figura 2), dichas estructuras se encontraban abiertas en su totalidad (Figura 3). Así mismo, no se evidenciaron diferencias estadísticas entre los sistemas de cultivo al evaluar la densidad de tricomas (número de tricomas/mm²), (Figura 2).

Los resultados obtenidos con respecto a la densidad estomática concuerdan con lo reportado por Marín, Vargas y Oropeza (2012), quienes encontraron presencia de estomas en hojas de *Dioscorea alata* provenientes de cultivo in vitro, además reportan que no existe diferencias significativas en el tamaño de las estomas de plantas de esta especie cultivadas en condiciones in vivo con respecto a las micropropagadas. Lo cual, evidencia que las plantas mantenidas in vitro responden a las condiciones ambientales

del cultivo y, por lo tanto, reierten al fenotipo de la planta madre crecida in vivo, cuando pasan por un proceso de aclimatación, entonces se pone en evidencia la plasticidad fenotípica de la especie vegetal en estudio (Marín et al., 2012).

Lo anterior, permite argumentar que el buen desarrollo de estomas y tricomas de las plantas cultivadas en los dos sistemas promovieron una buena climatización de estas plantas bajo condiciones de casa malla.

Con relación al efecto ejercido por el tiempo dentro de cada sistema de cultivo sobre el desarrollo de hojas se observó que dicho efecto fue nulo, por tanto, no se observó diferencias significativas entre los periodos de tiempo evaluados.



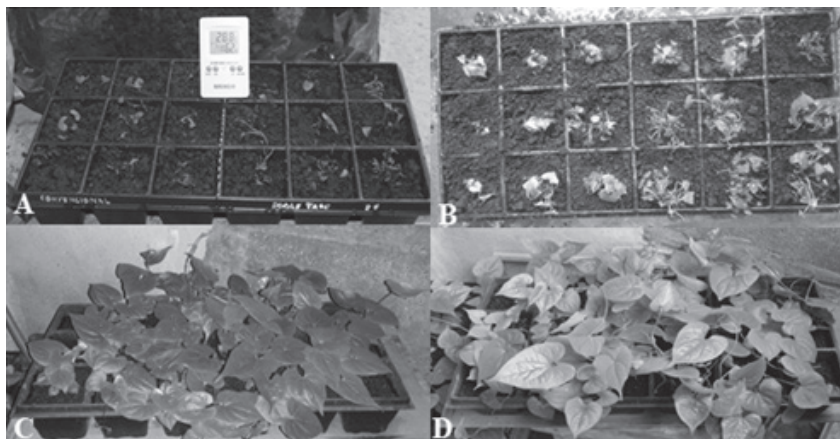


Figura 4. Evaluación del porcentaje de supervivencia ex vitro de *Dioscorea rotundata* cv, Botón en sistema de cultivo doble fase (DF) y sistema de cultivo semisólido (SS).

Figura 5. Plántulas de *D. rotundata* cv. Botón proveniente de los sistemas de cultivo SS y DF, transferidas a condiciones ex vitro. A. plantas de 90 días de micropropagación en el primer día en condiciones ambientales. B. Material vegetal 20 días después de su cultivo ex vitro. C. Plantas climatizadas de 50 días de edad. D. Plantas climatizadas de 60 días en condiciones ex vitro.

Fuente: elaboración propia

Del mismo modo, se logró constatar que el buen desarrollo radicular sumado al buen desarrollo anatómico y fisiológico de las estructuras aéreas de las plántulas pudo haber favorecido los altos porcentajes de supervivencia (100%) (Figura 4), observados al climatizar las plántulas en casa malla, razón por la cual el sistema de cultivo y el tiempo de incubación de estas no afectó su supervivencia durante esta fase de la micropropagación (Figura 5).

Conclusiones

La implementación del sistema de cultivo doble fase para la propagación in vitro de *D. rotundata*, cv. Botón, permitió aumentar el crecimiento y desarrollo de plantas in vitro, a la vez que se reduce el tiempo y los costos de producción del material. Convirtiéndose en el primer reporte de un sistema altamente promisorio y de bajo costo para la producción de

material de siembra de buena calidad para la especie, el cual podría servir como base al implementarlo en otros ejemplares comerciales del género *Dioscorea*.

Referencias Bibliográficas

- Acosta, R. y Beltrán, J. (2000). Estandarización de la técnica de micropropagación para la obtención masiva de plantas de ñame espino (*D. rotundata*) mediante el cultivo in vitro de segmentos nodales. (Tesis de pregrado). Universidad de Sucre. Sincelejo.
- Agronet. (2014). Anuario estadístico del sector agropecuario 2013. ISSN: 2346-4089.
- Agronet. _____ (2016). Recuperado de: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>
- Amusa, N., Adegbite, A., Muhammed, S. y Baiyewu, R. (2003). Yam diseases and its management in Nigeria. *Afr. J. Biotechnol*, 2(12), 497-502.
- Ascough, G. y Fennell, C. (2004). The regulation of plant growth and development in liquid culture. *S. Afr. J. Bot*, 70(2), 181-190.
- Bonilla, M. y Hernández, O. (2012). Propagación in vitro de ñame (*Dioscorea* spp.): Una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma. *Agron*, 20(2), 65-76p.
- Borges, M., Destrade, R., Rodríguez, S., Kosky, R., Malaurie, Hamon, P. Y Demenorval, L. (2011). Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. *Rev. Col. Biot*, 13(2), 221-228p.
- Borges, M., Meneses, S., Aguilera, N. y Vazquez, J. (2004). Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 76, 87-89.
- Cabrera, M. (2009). Empleo de métodos biotecnológicos para la propagación de ñame. *Biot. Veg*, 9(4), 195-209.
- Campo, R. (2011). Manejo integrado de la antracnosis (*colletotrichum* spp.) en ñame (*Dioscorea alata*), mediante el uso de alternativas para reducir el inoculo primario, la dispersión y el establecimiento del patógeno. Recuperado el 7 de junio de 2016. Recuperado de: <http://web.www3.unicordoba.edu.co/sites/default/files/Infor->

Micropropagación de ñame espino (*dioscorea rotundata*, poir), cultivar botón en sistema de cultivo doble fase

me%20Final%20FCA%2003-08%20Rodrigo%20Campo%20Ara-
na.pdf

- Chu, E. y Figueredo, R. (2002). Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. *Plant. Cell. Tissue. Organ. Cult.* 70(1), 241-249.
- Debergh, P. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant.* 59(1), 270-276.
- Díaz, L., Carmona, O., y Beltrán, J. (2015). Optimización de la conservación in vitro de germoplasma de *Dioscorea* spp por crecimiento mínimo. *Rev. colomb. Biotecnol.* 17(1), 32-39.
- Domínguez, Sh., Meneses, R., Aparecida, T. y Scherwinski, J. (2013). A new procedure for in vitro propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. *Sci Hortic*, 161, 204-209.
- Fundación PROCARIBE. (2012). Guía práctica para el manejo orgánico de cultivo de ñame tipo exportación. Recuperado el 15 de agosto 2016. Recuperado de: https://issuu.com/swissaid-ko/docs/cartilla_ame_julio_2012
- Gawel, N. y Robacker, C. (1990). Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semisolid versus liquid proliferation media. *Plant. Cell. Tissue. Org. Cult.* 23(1), 201-204.
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2009). Exportadores de ñame de la mano del ICA. Recuperado el 25 de junio de 2016. Recuperado de: <http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2009/Exportadores-de-name-de-la-mano-del-ICA.aspx>
- Marín, E., Vargas, T. y Oropeza, M. (2012). Variabilidad genética y anatomía foliar comparada de plantas de *Dioscorea alata* mantenidas en cultivo in vitro. *Interciencias*, 37(6), 477-483.
- Medero, V., Del Sol, L., García, M., López, J. y Rodríguez, S. (1999). Metodología para la propagación del clon de ñame “Blanco o Pelú”. *Resúmenes de BIOCAT99*, Granma Cuba, pp. 12.
- Mendiburu, F. (2016). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-4. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>

- Plan General de Asistencia Técnica Municipio de Chalán. (2013). Recuperado de: <http://chalan-sucre.gov.co/apc-aa-files/66313336653063613665666139613230/documento-plan-general-de-asistencia-tecnica-pgat.pdf>
- Preil, W. (2005). General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for in vitro culture. En: A. Hvoslef-Eide., y W, Preil (Ed.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp. 1-18). Ahrensburg, Germany: Springer.
- R core team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Recuperado de: <https://www.R-project.org/>.
- Reina, Y. (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, D. (2015). Obtención de minitubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir) cv. 'Blanco de Guinea' a partir de plantas in vitro y su respuesta en campo. (Tesis de Maestría). Biotecnología Vegetal. Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas. Santa Clara.
- Salazar, R. y Beltrán, J. (2002). Microtuberización en ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de botella". *Rev. colomb. biotecnol.* 4(2), 27-32.
- Sánchez, C. y Hernández, L. (2003). Descripción de aspectos productivos, de postcosecha y de comercialización del ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar. *Corpoica*.
- Scherwinski, J., Araruna, E., Da silva, T., Gomes, A., Maciel, S. y da Silva, F. (2012). Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *Plant. cell. tiss. organ. cult.* 109, 263-269.
- Senapatí, Sk. (2015). A double phase culture system: An economic and time saving protocol for in vitro propagation of plant. *Saj. Biotechnol.* 1(3), 301.
- Suárez I, Aramendiz H y Pastrana I. (2009). Micropropagación de Caña Flecha (*Gynerium sagittatum* Aubl.), *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 62(2):5135-5143.
- Tejeda, L., Tejeda, C., Villabona, O., Tarón, A., Barrios, R., y Tejeda, L. (2007). Aprovechamiento del ñame espinoso (*Dioscorea rotundata*) en la producción de bioplásticos. *Prospectiva*, 5(1), 68-74.

Micropropagación de ñame espino (*dioscorea rotundata*, poir), cultivar botón en sistema de cultivo doble fase

- Thurston, D. (1998). Tropical plant diseases. New York, Estados Unidos de America: The American Phytopathological Society. 2da Eds. 79-82 p.
- Vidoy, I. (2014). Rejuvenecimiento y micropropagación de olivo (*Olea europea* L) (Tesis doctoral). Universidad de Málaga, Málaga, España.
- Yan, H., Yang, L., y Li, Y. (2011). Improved growth and quality of *Dioscorea fordii* Prain et Burk and *Dioscorea alata* plantlets using a temporary immersion system. *Afr. J. Biotechnol*, 10(83), 19444–19448.
- Ziv, M. (1995). In vitro accimatization. En: Aitken, J., Kozai, T. y Smith, M. (Ed.), *Automation an environment control in plant tissue culture* (p. 493-516). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer academic Publisher.
- Ziv, M. (2005). Simple bioreactor for mass propagation of plants. *Plant. Cell. Tissue. Organ. Cult*, 81(3), 277-285.