

CAPÍTULO 3

EFECTO DEL GENOTIPO, TIPO DE EXPLANTE Y EL PICLORAM EN LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Dioscorea rotundata*

Heberto Polanco Ortega⁸
Lucía Candelaria Díaz Narváez⁹
Oscar Elías Carmona Wilches¹⁰
Eder Durango Ballesteros¹¹
Javier Darío Beltrán Herrera¹²
Isidro Elías Suárez Padrón¹³

8 Biólogo. Maestría en Biotecnología

9 Biólogo. Maestría en Biotecnología

10 Biólogo. Maestría en Biotecnología.

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

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

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

Introducción

El ñame pertenece al género *Dioscorea* y comprende alrededor de 600 especies cultivadas especialmente en África, siendo Nigeria el mayor productor a nivel mundial (Mandal, 1993; Rodríguez, 2000; Bustamante et al., 2003; Deepika et al., 2013). En Latinoamérica, Colombia es uno de los mayores productores seguido de Brasil, Cuba, Haití, República Dominicana, Costa Rica y Puerto Rico (Reina, 2012). A nivel nacional, las especies más cultivadas son *Dioscorea alata* (ñame criollo) y *Dioscorea rotundata* (ñame espino) principalmente cultivados en los departamentos de Sucre, Córdoba y Bolívar, los cuales aportan el 92% de la producción nacional (Campo, 2011; Reina, 2012; Agronet, 2016). El ñame espino es un cultivo propio de pequeños y medianos productores de la Costa Atlántica de Colombia, y priorizado en el departamento de Sucre por ser una de las principales fuentes de ingreso, empleo rural, área sembrada y alimentación. Así mismo, es un producto de exportación que le ha generado al país ingresos que superan los US\$2.5 millones anuales (Sánchez y Hernández, 2003; Fundación Procaribe, 2012).

A pesar de la importancia económica, social y nutricional del ñame, este presenta múltiples problemas que afectan su producción. Dentro de esta problemática se destacan las pérdidas de 20-30% y hasta del 50% durante la postcosecha y el almacenamiento debido a la susceptibilidad del tubérculo a las pudriciones y al ataque de microorganismos como bacterias, nematodos y hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Pérea y Buitrago, 2000; Pinzón, Bustamante y Buitrago, 2013; Reina, 2012; Rodríguez, 2015). En otro aspecto, algunos autores como Yan et al. (2011) afirman que la poca disponibilidad de material vegetal se presenta como la principal problemática a solucionar para un manejo eficiente del cultivo. De igual manera, la aplicación de la ingeniería genética se ha visto limitada por la ausencia de protocolos eficientes que permitan la regeneración de plantas y su transformación genética (Manoharan, Nath y Tripahi, 2016).

Frente a esta problemática, surge como alternativa el uso de la embriogénesis somática in vitro, definida como el proceso por el cual las células somáticas se desarrollan en plantas diferenciadas pasando por las etapas típicas embrionarias sin que exista fusión de gametos (Fehér, 2005; Hernández, 2013). Esta técnica se ha establecido en *D. rotundata* mediante el estudio de diferentes factores (Osifo, 1988; Suárez et al., 2011; Rodríguez et al., 2014; Manoharan et al., 2016), sin embargo, aún existen limitaciones en la fase de inducción, en la cual se han reportado porcentajes de inducción de masas proembriogénicas menores al 30%, recalcitrancia y genotipo-dependencia (Suárez et al., 2011; Rodríguez et al., 2014; Manoharan et al., 2016). Por esto, para lograr buenos resultados a través de la embriogénesis somática es necesario tener en cuenta los factores físicos y químicos que activen la ruta embriogénica (Namasivayan, 2007). Con base en lo planteado, con esta investigación se evalúa el efecto del genotipo, el tipo de explante y el efecto de reguladores de crecimiento como el picloram, para el cual hay escasas publicaciones con respecto a su uso como inductor de tejidos embriogénicos en *D. rotundata* (Manoharan et al., 2016).

La embriogénesis somática aplicada al ñame espino puede favorecer la propagación masiva de plantas (Hernández, 2013), permite el cultivo de un gran número de unidades reproductivas con raíces y meristemos en el mismo medio, minimizando la necesidad de enraizar como el método convencional (Bathia y Bera, 2015). Adicionalmente, el modo de cultivo se puede escalar usando embriones en medio líquido (Hernández, 2013). Así mismo, se favorece la transferencia de genes en células vegetales embriogénicas lo que constituye una alternativa al fitomejoramiento convencional. Bathia y Bera (2015) afirman que los embriones somáticos son los mejores candidatos para la transformación genética, así como su uso en la producción de semillas sintéticas. Con esta investigación se reportan avances en la etapa inducción de la embriogénesis somática en los cultivares Botón y Alemán de *D. rotundata* lo que a largo plazo puede favorecer la producción de material de siembra, así mismo, se convierte en un punto de partida para futuros programas de fitomejoramiento y producción de semilla sintética, todo esto en función de satisfacer las necesidades de aproximadamente 20 mil familias beneficiarias por este cultivo en el departamento de Sucre y la costa Atlántica.

Metodología

Ubicación Geográfica: Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología y Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, Sede Puerta Roja. Ubicado 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).

Inducción de masas proembriogénicas, inducción de callos y embriones. Se utilizaron segmentos de pecíolo y hoja con pecíolo de 1,5 cm de longitud aproximadamente, obtenidos a partir de plantas in vitro de 60 días de edad pertenecientes a la especie *D. rotundata* cultivares alemán y Botón, los cuales se depositaron en cajas de Petri, conteniendo medio de cultivo compuesto por Sales MS (Murashige y Skoog, 1962) (4,33 g L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹), mio-inositol (0,1 g L⁻¹), tiamina HCl (1 mg L⁻¹) y PTC Agar (6 g L⁻¹) (Durango y Oropeza, 2012; Suárez et al., 2011). Este medio fue suplementado con diferentes niveles de picloram (0, 1,2, 3 mg L⁻¹).

Los medios de cultivo con los explantes evaluados se incubaron bajo condiciones de oscuridad, ambos explantes se ubicaron horizontalmente sobre el medio de cultivo. Para las hojas con pecíolo se tuvo en cuenta que la cara abaxial de la lámina foliar estuviera en contacto con el medio. Al final de las 8 semanas se evaluó el porcentaje de masas proembriogénicas (Rodríguez et al., 2014), porcentaje de callos (Shu et al., 2005) y el número de embriones (Manoharan et al., 2016).

Diseño y análisis estadístico.

La investigación se realizó bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA), conformado por 16 tratamientos con 12 réplicas por tratamiento. A los datos obtenidos para la variable número de embriones, se aplicó la prueba no paramétrica de Wilcoxon y la prueba de comparación de Kruskal-Wallis. Todos los análisis estadísticos se procesaron en el programa R para Windows, Versión 3.0.4 con los paquetes agricolae y stats (Mendiburu, 2016; R Core Team, 2017).

Inducción de masas proembrogénicas.

Se evidenció la formación de masas proembriogénicas, las presentaron una coloración amarillenta y blanquecina (Figura 1), de aspecto nodular y

friable semejantes a las reportadas por Rodríguez et al. (2015). Se registraron estos tejidos en la cara adaxial de la hoja (Figura 1A) y en la base del pecíolo (Figura 1B) en el cv. Alemán, para el cv. Botón los tejidos embriogénicos se visualizaron en cara adaxial y en la base del pecíolo (Figura 1C y 1D). Se confirmó mediante la técnica de squash y tinción con Lugol la presencia de células embriogénicas presentes en las estructuras observadas, estas células presentaron forma redondeada (Figura 1E), con polaridad establecida, citoplasma denso y depósitos de almidón (Figura 1F), lo que concuerda con lo reportado por Manoharan, Nath y Tripathi (2016). Los depósitos de almidón pueden estar relacionados con el crecimiento y la regulación de la morfogénesis en el desarrollo de los embriones somáticos (Ulisses et al., 2016).

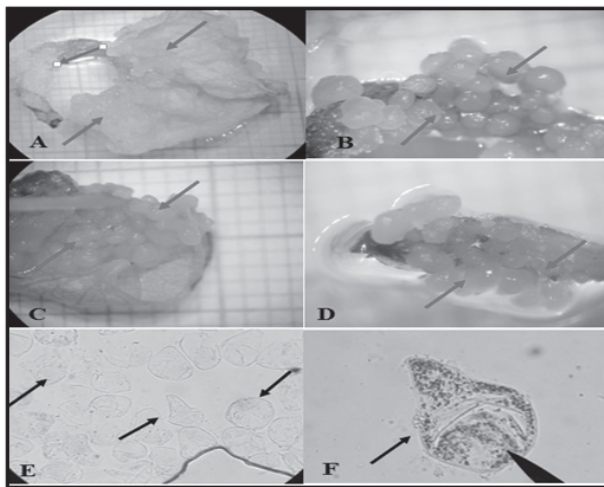


Figura 1. Masas proembriogénicas e histología de células embriogénicas en *D. rotundata*. A: Masas proembriogénicas en hoja con pecíolo cv. Alemán (flechas rojas) a las 8 semanas bajo el efecto de picloram (2 mg L⁻¹), en el mismo explante se observan callos indicados con flecha azul. B: Masas proembriogénicas en el pecíolo cv. Alemán (flechas rojas) a las 8 semanas bajo el efecto de picloram (3 mg L⁻¹). C: Masas proembriogénicas en hoja con pecíolo cv. Botón (flechas rojas) a las 8 semanas bajo el efecto de picloram (3 mg L⁻¹). D: Masas proembriogénicas en pecíolo cv. Botón (flechas rojas) a las 8 semanas bajo el efecto de picloram (3 mg L⁻¹). E y F: Células embriogénicas de *D. rotundata* cv. Alemán bajo el efecto del picloram (2 mg L⁻¹) a las 8 semanas. E: Células embriogénicas sin tinción, indicadas con flechas de color negro. F: Célula embriogénica teñida con Lugol, la flecha negra indica la polaridad de la célula, característica importante en la formación del embrión, así mismo se observan depósitos de almidón.

Durante la inducción de masas proembriogénicas se observó un mayor porcentaje de estas en el cultivar Alemán con respecto al cultivar Botón (Tabla 1), resultado que puede estar asociado al efecto del genotipo en la respuesta embriogénica; al respecto, Deo, Tyagi, Taylor, Harding y Beckert (2010) afirman que entre cultivares de una misma especie es posible encontrar diferencias en la inducción de tejidos embriogénicos, en razón a que algunos genotipos son inducidos con relativa facilidad y otros son recalcitrantes. En ese aspecto, Torres (2007) evaluó la respuesta embriogénica de tres cultivares de *D. rotundata* reportando que los cultivares UC90 y 086 registraron el mayor porcentaje de masas proembriogénicas a diferencia del cultivar 1172, que presentó una respuesta menor. Así mismo, Belarmino y Gonzales (2008) para *D. alata* en la fase de inducción obtuvieron mayor respuesta en la variedad VU-2 en comparación a la variedad Kinampay. Otros autores como Viana y Mantell (1989) reportaron mayor frecuencia de callos inducidos en *D. composita* con respecto a lo obtenido en *D. cayennensis*.

Tabla 1. *Porcentaje de masas proembriogénicas en función del genotipo, tipo de explante y concentraciones de picloram.*

Porcentaje de masas proembriogénicas				
Picloram (mg L ⁻¹)	Alemán		Botón	
	Pecíolo	Hoja con pecíolo	Pecíolo	Hoja con pecíolo
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	58,33	75,00	0,00	25,00
2	50,00	91,67	8,33	50,00
3	75,00	50,00	25,00	16,67

Fuente: *Cálculos del estudio*

Lo planteado indica que en el género *Dioscorea*, el genotipo juega un papel importante en la inducción de tejidos embriogénicos. En la especie *D. rotundata* de acuerdo a los resultados obtenidos es recomendable la utilización de vitroplantas del cultivar alemán para la inducción de masas proembriogénicas. De igual manera, los resultados obtenidos difieren de los reportados para esta especie por Suárez et al (2011) y Rodríguez et al (2014) quienes obtuvieron porcentajes <30% y de 6% respectivamente,

usando hojas con pecíolo y 2,4-D como auxina. Lo que indica que con picloram para esta misma especie los porcentajes de inducción de tejidos embriogénicos pueden superar el 90 %. Esto concuerda con lo planteado por Vacca et al. (2015) quienes reportaron hasta un 95,22 % de tejidos embriogénicos en la especie *Pterogyne nitens*.

En otras especies como *Ipomea batatas* también se ha evidenciado respuestas diferentes entre los cultivares, e inclusive respuesta nula como lo reportado por Triqui et al. (2008) en los cultivares Duclos 11, Guangshu y 953 bajo el efecto del picloram y 2,4-D. La ausencia de respuesta en los genotipos puede estar determinada por la etapa y estado fisiológico de las vitroplantas (Triqui et al., 2008). La menor respuesta en el cultivar Botón puede deberse a una recalcitrancia, que consiste en una nula o baja respuesta morfogénica asociada con células vegetales, tejidos y órganos que no tienen la capacidad de responder a las manipulaciones in vitro (Benson, 2000). La recalcitrancia en este cultivar se presentó para las tres variables evaluadas, resultado que es común para plantas tropicales, las cuales pueden tener compuestos fenólicos que liberados al medio de cultivo pueden inhibir la actividad de algunas proteínas afectando la embriogénesis somática (George, 2008). Sin embargo, la recalcitrancia presente en un cultivar puede resolverse optimizando las condiciones de cultivo o seleccionando mejor el explante (Hernández, 2013).

Con respecto a los tipos de explantes el mayor porcentaje de inducción de masas proembriogénicas se logró en hojas con pecíolo para ambos cultivares (Tabla 1), presentándose el mayor porcentaje de inducción en el cv. Alemán (91,67 %). Estos resultados se obtuvieron empleando una concentración de picloram de 2 mg L⁻¹, la cual resultó ser la más eficiente para la inducción de masas proembriogénicas en ambos cultivares utilizando hojas con pecíolo (Tabla 1). Por su parte, la concentración 3 mg L⁻¹ es la más apropiada para la inducción de estas estructuras en pecíolos para los dos cultivares evaluados, esto indica que los tipos de explantes responden de forma diferente a los niveles de auxina utilizado. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado en *D. rotundata* por Suárez, Torres y Litz (2011) y Rodríguez et al. (2014) quienes obtuvieron mayor respuesta embriogénica utilizando hojas con pecíolo.

En ese sentido, lo anterior guarda relación a lo obtenido en *Ipomea batatas* por Guevara et al. (2012) quienes lograron mayor respuesta utilizando

hojas con pecíolo, según estos autores, es posible que dichos resultados se deban al área de contacto del explante con el medio. Sin embargo, la respuesta embriogénica evidenciada puede depender de la presencia de células competentes capaces de inducir la embriogénesis somática en respuesta a un estímulo externo (Fehér et al., 2003). La competencia celular está asociada con la desdiferenciación de las células somáticas que les permite responder a las nuevas señales del desarrollo (Fehér, 2008; Yang y Zhang, 2010). Las células competentes se encuentran en un estado transicional en el cual bajo un estímulo exógeno pueden convertirse en embriogénicas (Toonen et al., 1994; Namasivayan, 2007), la competencia celular está relacionada con la utilización de tejidos jóvenes ya que pueden ser más susceptibles de responder a señales externas de inducción y reprogramación celular (Deo et al., 2010), para esta investigación se tuvieron en cuenta vitroplantas que no superaran los 60 días de edad.

Inducción de callos

Los callos obtenidos tenían apariencia cristalina y filamentosa (Figura 2A) en algunos casos asociados con masas proembriogénicas (Figura 1A). Estos callos de acuerdo con la histología realizada estaban conformados por células no embriogénicas, las cuales presentaron forma alargada, desprovistas de núcleo y poco contenido citoplasmático (Figura 2B) características semejantes a las encontradas por Ramírez y García (2012). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Manoharan et al. (2016) quienes reportan la presencia de callo no embriogénico semejante a motas de algodón.

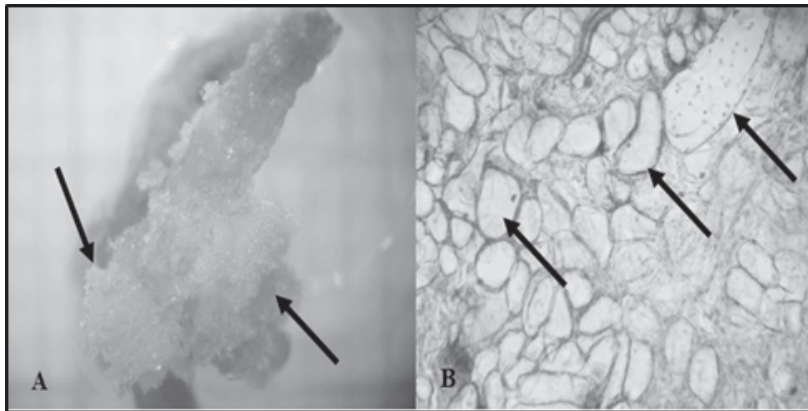


Figura 2. Callos inducidos y células no embriogénicas en *D. rotundata* cv. Alemán mediante el uso de picloram (2 mg L^{-1}) a las 8 semanas. A: Callos obtenidos en hojas con pecíolo (indicadas flechas negras). B: Células no embriogénicas a partir de callos en hojas con pecíolo (indicadas con flechas negras).

La presencia de estas estructuras se evidenció con un mayor valor en el cv. Alemán con respecto al cv. Botón, utilizando hojas con pecíolo (66,67%) bajo el efecto del picloram a 2 mg L^{-1} (Figura 3) lo que guarda relación con el mayor porcentaje de masas proembriogénicas inducidas. Las células no embriogénicas o carentes de competencia embriogénica, parece ser que sinergizan la formación de tejidos embriogénicos, lo que implica que son necesarias para que se produzca la embriogénesis (Chasan, 1992). La presencia de estos tejidos es un evento común en la embriogénesis somática asociado a los niveles de metilación del ADN durante la etapa de inducción. La metilación del ADN en tejidos no embriogénicos es mayor con respecto a los tejidos embriogénicos como lo describió Noceda et al. (2009) en la embriogénesis somática en *Pinus*, de igual forma a lo reportado en *Eleuterococcus senticosus* en la cual el callo no embriogénico mostró una mayor metilación del ADN (16,99%) con respecto al tejido embriogénico (11,20%) (Chakrabarty et al., 2003), sin embargo, es un tema que requiere múltiples estudios, y para *D. rotundata* aún no hay reportes que expliquen la presencia de tejidos embriogénicos y no embriogénicos desde el punto de vista bioquímico.

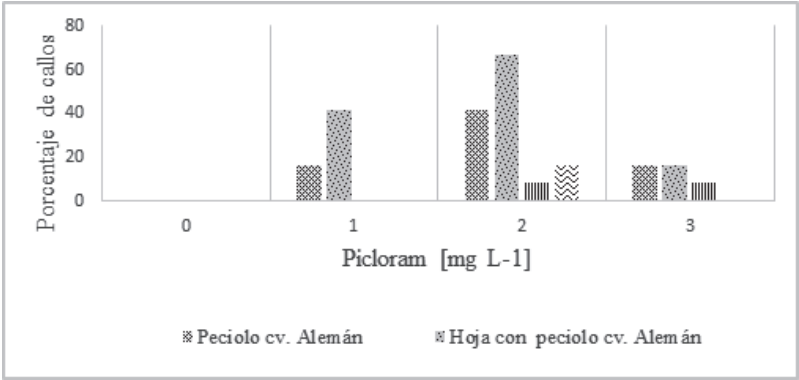


Figura 3. Efecto del picloram, el genotipo y el tipo de explante en la inducción de callos en ñame espino.

Inducción de embriones somáticos.

Se logró la formación de embriones somáticos, los cuales se observaron de color crema opaco, ubicados sobre las masas proembriogénicas (Figura 4), se obtuvo un mayor promedio de embriones somáticos en el cultivar alemán con respecto al cultivar Botón (Tabla 2), entre los cuales se presentaron diferencias significativas, lo cual indica que el genotipo influye en la obtención de embriones somáticos en ñame espino. Así como en las variables anteriores, el genotipo es un factor que controla las respuestas morfogénicas sobre todo en la embriogénesis somática. La influencia genotípica puede tener una base genética, algunas investigaciones al respecto sugieren la ocurrencia de fenómenos epigenéticos como la condensación de la cromatina (Hernández, 2013), se ha revelado que la heterocromatina se caracteriza por la metilación de citosina e histona H3, otros estudios indican la participación de RNAs de interferencia en la condensación de la cromatina. Los patrones de metilación de ADN son hereditarios y se pueden mantener con la mitosis (Rose et al., 2010).

Tabla 2. Efecto del picloram, el genotipo y el tipo de explantes en la inducción de embriones somáticos de *D. rotundata*.

Promedio Número de embriones				
Picloram (mg L ⁻¹)	Alemán		Botón	
	Pecíolo	Hoja con pecíolo	Pecíolo	Hoja con pecíolo
0	0 Ba	0 Ca	0 Ba	0 Ba
1	0,17 Bb	4,25 ABa	0 Bb	1,75 ABa
2	3,00 Ab	7,08 Aa	0,67 ABb	3,50 Aa
3	3,92 Aa	4,17 BCa	2,00 Aa	1,92 ABb

Letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los niveles de sacarosa para cada matriz según prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$, y letras minúsculas representan diferencias significativas entre matrices para cada nivel de azúcar según prueba de Wilcoxon para $p < 0,05$.

Así mismo, dentro del cultivar alemán se presentaron diferencias significativas entre los tipos de explante utilizados, siendo mayor el promedio de embriones obtenidos en hoja con pecíolo (Tabla 2), demostrando que el tipo de explante utilizado puede influir en la respuesta embriogénica. De igual manera, para el cultivar Botón se presentaron diferencias estadísticas entre los dos tipos de explantes utilizados, siendo mayor el promedio obtenido en hojas con pecíolo bajo el efecto de 2 mg L⁻¹ de picloram. Con base en estos resultados se afirma que la hoja con pecíolo es el explante indicado para lograr la inducción de embriones somáticos en ambos cultivares, logrando una mayor respuesta en el cultivar alemán. Esta respuesta podría estar asociada a una mayor presencia de células competentes a nivel de genotipo/explante. Adicionalmente, los resultados obtenidos pueden depender de otros factores como el nivel endógeno de fitohormonas de los explantes (Gaj, 2004). Se considera que los explantes y cultivos que responden a la transición embriogénica presentan una acumulación de auxinas endógenas (AIA), lo cual se ve influenciado por las condiciones de cultivo determinando el destino embriogénico de una célula en cultivo (Thomas, 2008).

El análisis estadístico aplicado a esta variable demuestra que las concentraciones de picloram evaluadas presentaron diferencias

significativas, obteniéndose mayores resultados con el nivel de 2 mg L⁻¹ en hojas con pecíolo para ambos cultivares (Tabla 2). El ácido 4-amino-3, 5, 6-trichloropicolínico (picloram), es un herbicida auxínico que posee propiedades similares a las auxinas naturales y favorece la inducción de tejidos embriogénicos que de acuerdo con Manoharan et al (2016) en *D. rotundata* puede emplearse en el rango de 0,5 a 16 mg L⁻¹ de concentración. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Manoharan et al. (2016) quienes evaluaron el efecto del picloram de forma individual y combinada con sulfato de cobre, caseína hidrolizada y prolina reportando la inducción de callo y de estructuras parecidas a embriones, así como la inducción de embriones somáticos. En contraste con la presente investigación, estos autores emplearon yemas axilares como explante, teniendo en cuenta que la utilización de hojas con pecíolo adherido no fue eficiente para la obtención de estos tejidos. Así mismo, estos resultados difieren de los obtenidos por Belarmino y González (2008) en *D. alata* quienes reportaron que el uso de picloram es esencial para la inducción de la embriogénesis somática utilizando una concentración de 1 mg L⁻¹. Autores como Durango y Oropeza (2012) lograron mayor inducción de embriones con niveles de picloram de 4,8 mg L⁻¹ en *D. alata* cultivares Concha de coco y Criollo.

Es importante mencionar que son pocas las investigaciones sobre la inducción de embriones somáticos en *D. rotundata* a nivel departamental y nacional con respecto al uso de picloram, solo algunas investigaciones a nivel internacional como la de Manoharan et al. (2016) han evaluado el efecto de esta auxina en la obtención de tejidos embriogénicos. Por lo tanto el presente trabajo contribuye al conocimiento del efecto del picloram en la embriogénesis somática de *D. rotundata*.

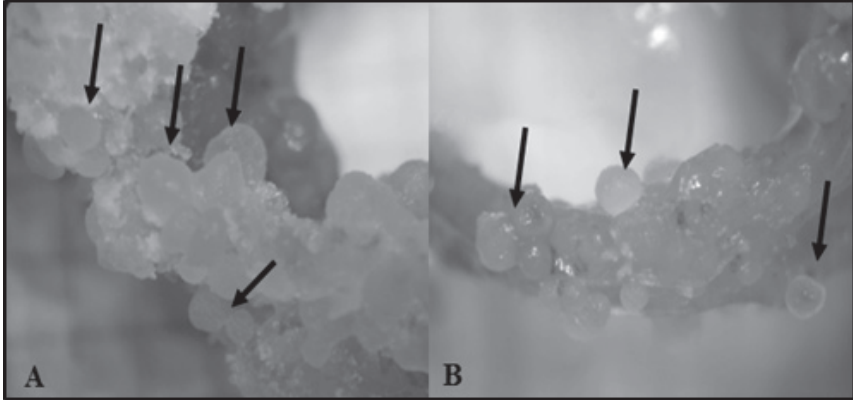


Figura 4. Embriones somáticos de *D. rotundata* inducidos en hojas con pecíolo bajo el efecto de picloram (2 mg L⁻¹) a las 8 semanas (indicados con flechas negras) A. Embriones somáticos de cv. Alemán. B. Embriones somáticos de *D. rotundata* cv. Botón.

Tabla 3. Efecto del picloram, el genotipo y el tipo de explantes en la inducción de embriones somáticos de *D. rotundata*.

Promedio Número de embriones				
Picloram (mg L ⁻¹)	Alemán		Botón	
	Pecíolo	Hoja con pecíolo	Pecíolo	Hoja con pecíolo
0	0 B a	0 C a	0 B a	0 B a
1	0,17 B b	4,25 AB a	0 B b	1,75 AB a
2	3,00 A b	7,08 A a	0,67 AB b	3,50 A a
3	3,92 A a	4,17 BC a	2,00 A a	1,92 AB b

Letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los niveles de sacarosa para cada matriz según prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$, y letras minúsculas representan diferencias significativas entre matrices para cada nivel de azúcar según prueba de Wilcoxon para $p < 0,05$.

Conclusión

El genotipo, el tipo de explante y el picloram influyen en la inducción de masas proembriogénicas, callos y número de embriones en la especie *D. rotundata*. Por esto, para el establecimiento de la embriogénesis somática

en *D. rotundata* se debe considerar el uso de hojas con pecíolo del cultivar alemán bajo el efecto de una concentración de 2 mg L⁻¹ de picloram. En este sentido, se demostró que es posible inducir masas proembriogénicas en el cultivar alemán con un porcentaje superior al 90%, lo cual constituye una base experimental para futuras investigaciones sobre la optimización de la embriogénesis somática en esta especie.

Referencias Bibliográficas

- Agronet. (2016). Evaluaciones Agropecuarias Municipales. Recuperado de: <http://www.agronet.gov.co/Paginas/estadisticas.aspx>
- Bathia, S., y Bera, T. (2015). Somatic and Organogenesis. En: Bathia, S. (Ed.), *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (pp. 209-230). San Diego, U.S.A: Elsevier.
- Belarmino, M. M., y Gonzales, J. R. (2008). Somatic embryogenesis and plant regeneration in purple food yam (*Dioscorea alata* L.). *Annals of Tropical Research*, 30(2), 22-33.
- Benson, E. E. (2000). Special symposium: in vitro plant recalcitrance. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36_ 141-148.
- Bustamante, S., Guzmán, M., y Buitrago, G. (2003). Caracterización molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando “DNA Amplification Fingerprinting (DAF)” en condiciones radioactivas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5 (2), 57-63.
- Campo, R. (2011). Manejo Integrado de la Antracnosis (*Colletorichum* spp.) en ñame (*Dioscorea alata*), Mediante el Uso de Alternativas para Reducir el Inoculo Primario, la Dispersión y el Establecimiento del Patógeno. Universidad de Córdoba, Montería, Córdoba
- Chakrabarty, D., Yu, K., y Paek, K. (2003). Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Science*, 165, 61-68.
- Chasan, R. (1992). Developing somatic embryos. *The Plant Cell*, 4, 367-368.
- Deepika, V., Jayaram, K., y Anima, P. (2013). Isolation and physicochemical characterization of sustained releasing starches from *Dioscorea* of Jharkhand. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55 (1), 193-200.

- Deo, P., Tyagi, A., Taylor, M., Harding, R., y Becker, D. (2010). Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 28 (1), 27-40.
- Durango, E., y Oropeza. (2012). Embriogénesis somática de ñame (*Dioscorea alata* L): una alternativa para la propagación y conservación. *Memorias, Primer congreso venezolano de ciencia tecnología e innovación*.
- Fehér, A. (2005). Why somatic plant cells start to form embryos? En: A. Mujib y J. Samaj (Ed.), *Somatic embryogenesis* (pp. 85-101). Berlin, Alemania: Springer-Verlag.
- Fehér, A. (2008). The initiation of somatic embryogenesis: What we know and what we don't. *Acta Biologica Szegediensis*, 52 (1), 53-56.
- Fehér, A., Pasternak T, P., y Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, 201-228.
- Fundación Procaribe. (2012). Guía Práctica para el manejo orgánico de cultivo de ñame tipo exportación. Recuperado de http://www.swissaid.org.co/sites/default/files/Cartilla%2B%C3%91ame_Julio%2B2012.pdf
- Gaj, M. (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulator*, 43(1), 27-47.
- George, E, F. (2008). Plant tissue culture procedure-Background. En: Edwin G. George, Michael A. Hall y Geert-Jan De Klerk (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition Volume 1. The Background*. Springer, The Netherlands. Pp 1-28.
- Guevara, Y., Suárez, I., y Salgado, J. (2012). Inducción y proliferación in vitro de tejidos celulares de batata (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) en medio con 2,4-D. *Temas Agrarios*, 17(2), 9-17.
- Hernández, E. (2013). Embriogénesis somática in vitro y aclimatación de plántulas obtenidas por organogénesis directa en *Heliconia* spp (tesis doctoral). Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco Edo. De México, México.

- Mandal, R.C. (1993). *Tropical Root and Tuber Crops*. India: Agrobotanical Publishers.
- Manoharan, R., Nath, J., y Tripathi, L. (2016). Plant regeneration from axillary bud derived callus in white yam (*Dioscorea rotundata*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 123 (3), 481-497.
- Mendiburu, F. (2016). *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-4. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Namasivayam, P. (2007). Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90(1):1-8.
- Noceda, C., Salaj, T., Pérez, M., Viejo, M., Cañal, J., y Salaj, J. (2009). DNA methylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. *Cell Culture.Trees*, 23, 1285-1293.
- Ortega, R., Beltrán, J., y Marrugo, J. (2011). Acumulación de mercurio (Hg) por caña flecha (*Gynerium sagittatum*) (Aubl) Beauv. in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(1), 33-41.
- Osifo, E. (1988). Somatic embryogenesis in *Dioscorea*. *Journal of Plant Physiology*, 133(3), 378-380.
- Perea, M., y Buitrago, G. (2000). Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo de ñame. En: Guzmán, M y Buitrago, G. (Ed.), *Ñame: producción de semilla por biotecnología* (p. 17-32). Bogotá, Colombia: Unibiblos.
- Pinzón, Y., Bustamante, S., y Buitrago, G. (2013). Diagnóstico molecular diferencial *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 52-60.
- Ramírez, Maribel., y de García, Eva. (2012). Características marcadoras en suspensiones celulares embriogénicas de banano cien bta-03 (AAA) y su parental williams (AAA). *Bioagro*, 24(2), 73-82.
- Reina, Y. (2012). *El Cultivo De Ñame En El Caribe Colombiano*. Cartagena, Colombia: Banco de la República.
- 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). Universidad Central Martha Abreu de las Villas, Santa Clara, Cuba.

- Rodríguez, D., López, J., Montano, N., Rayas, A., Basail, M., Beovides, Y., Santos, A., Medero, V., y Gutierrez, Y. (2014). Formación de callos con estructuras embriogénicas en *Dioscorea rotundata* Poir cv. Blanco de Guinea. *Biotecnología Vegetal*, 14(3), 185-188.
- Rodríguez, W. (2000). Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía mesoamericana*, 11 (2), 133-152.
- Rose, R., Mantiri, F., Kurdyukov, S., Chen, S., Wang, X., Nolan, K., y Sheahan, M. (2010). Developmental biology of somatic embryogenesis. En: E. Pua y M. Davey (Ed.), *Plant Developmental biology- Biotechnological Perspectives: Vol.2* (pp. 3-26). Berlin, Alemania: Springer-Verlag.
- Sánchez, C., y L. Hernández. (2003). Descripción de Aspectos Productivos de Postcosecha y de Comercialización del Ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar. Corpoica.
- Shu, Y., Ying-Cai, Y., y Hong-Hui, L. (2005). Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 80(2), 157-161.
- Suárez, I., Torres, L., y Litz, R. (2011). Somatic embryogenesis in yam (*Dioscorea rotundata*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 64(2), 6037-6042.
- Thomas, T.D (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26,618-631.
- Toonen MAJ, Hendriks T, Schmidt Ed DL, Verhoeven HA, Van Kammen A, de Vries SC (1994) Description of
- Torres, L. (2007). Embriogénesis en Ñame (*Dioscorea spp*) a partir de Explantes Foliare (tesis de pregrado). Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.
- Triqui, Z., Guedira, A., Chlyah, A., Chlyah, H., Souvannavong, V., Haicour, R., y Sihachakr, D. (2008). Effect of genotype, gelling agent and auxin on the induction of somatic embryogenesis in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam). *Comptes Rendus Biologies*, 331,198-205.
- Ulisses, C., Pereira, J., Silva, S., Arruda E., y Morais, M. (2016). Indução e histologia de embriões somáticos primários e secundários do híbri-

- do Phalaenopsis Classic Spotted Pink (Orchidaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 21(3), 571-580.
- Vacca, M., Avilés, Z., Bonomo, M., y Díaz, L. (2015). Efecto del picloram en la inducción de embriogénesis somática en *Pterogyne nitens* Tul. “tipa colorada”. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 11(3), 771-777.
- Viana, A. y Mantell, S. (1989). Callus induction and plant regeneration from excised zygotic embryos of the seed-propagated yams *Dioscorea composita* Hemsl. And *D. cayennensis* Lam. *Plant cellular, Tissue and Organ Culture*, 16, 113-122.
- 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. *African Journal of Biotechnology*, 10(83), 19444 – 19448.
- Yang, J., y Zhang, X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(1), 36-57.