

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BOTANICA



***“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y NUTRICIONAL
DE SEIS MATERIALES DE ÑAME (DIOSCOREA SPP.) Y
SU ESTABLECIMIENTO IN VITRO”***

Tesis Doctoral presentada ante la
ilustre Universidad Central de
Venezuela por la Licenciada en
Biología Mayelí Carolina Moreno
Peña, para optar al título de Doctora
en Ciencias mención Botánica.

Tutora: Dra. Maira Oropeza

Caracas – Venezuela
Diciembre-2016



BOTANICA
FACULTAD DE CIENCIAS



Comisión de Estudios de Postgrado



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

VEREDICTO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la **Tesis Doctoral** presentada por: la Lic. **Mayelí Carolina Moreno Peña**, Cédula de Identidad N° **V-18.942.763**, bajo el título **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y NUTRICIONAL DE SEIS MATERIALES DE ÑAME (*Dioscorea* spp.) Y SU ESTABLECIMIENTO *IN VITRO***, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN BOTÁNICA**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 14 de Diciembre de 2016 a las 09:00 AM., para que la autora lo defendiera en forma pública, lo que ésta hizo en la Sala "Usos Múltiples" del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

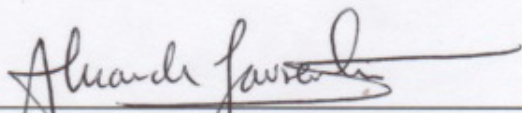
2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLA**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por la autora, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado es un aporte importante a la caracterización y conservación de la diversidad biológica del ñame, además de contribuir significativamente al logro de la soberanía alimentaria.

for
Aut.
JTH
Ery
Amak.

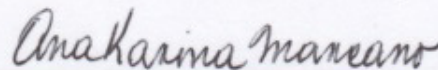
3.- El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de **EXCELENTE** al presente trabajo por considerarlo de excepcional calidad ya que integra distintos aspectos para la caracterización del germoplasma de este cultivo y el manuscrito comprende un excelente basamento teórico así como una redacción que atiende a una estructura gramatical y ortográfica de excelente calidad y fácil comprensión.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 14 días del mes de Diciembre del año 2016, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinadora del jurado la tutora Dra. Maira Oropeza.



Dr. Alexander Laurentin
C.I. 9.565.764
(IBE-UCV)

Jurado designado por el Consejo
de la Facultad

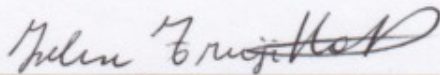


Dra. Ana Karina Marcano

C.I. 11.199.292

(IBE-UCV)

Jurado designado por el Consejo
de la Facultad

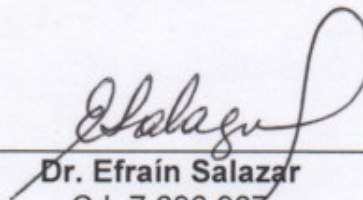


Dra. Iselen Trujillo

C.I. 6.524.760

(IDECYT-UNESR)

Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado

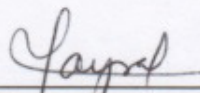


Dr. Efraín Salazar

C.I. 7.696.987

INIA

Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado



Dra. Maira Oropeza

C.I. 6.371.626

(IBE-UCV)

Tutora

I. RESUMEN

Caracterización morfológica y nutricional de seis materiales de ñame (*Dioscorea* spp.) y su establecimiento *in vitro*.

El ñame (*Dioscorea* spp.) se cultiva principalmente en zonas tropicales y subtropicales de varias regiones del mundo. En Venezuela, el ñame es un recurso vegetal subutilizado, cuyo desarrollo intensivo y extensivo ha estado limitado entre otras causas, por la poca disponibilidad de material de plantación con óptima calidad fisiológica y sanitaria, a pesar de las excelentes cualidades alimenticias de sus tubérculos. En el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) se mantienen algunas variedades de ñame que no han sido estudiadas a profundidad, para su posterior uso en programas de mejoramiento genético. El objetivo general de este trabajo fue caracterizar a nivel morfológico, molecular y nutricional seis materiales de ñame (D2, D7, D8, D13, colombiano y venezolano) donados por dicha institución y establecer su cultivo *in vitro* para la creación de un banco de germoplasma.

La caracterización morfológica se realizó utilizando la lista de descriptores para el género *Dioscorea* publicada por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGR) y el Instituto Internacional de Agricultura Tropical y se complementó con la caracterización molecular utilizando marcadores moleculares AFLP. El análisis estadístico de agrupamiento permitió obtener dendrogramas que separan los seis materiales de ñame en tres grupos, siendo el clon D7 y el clon venezolano los que comparten mayor número de características morfológicas, mientras que a nivel molecular, los genotipos del clon D7 y del clon D8 son muy similares. La caracterización molecular arrojó un polimorfismo de 77,62 % demostrando que no hay duplicados en la colección y que los seis materiales son variedades distintas de ñame.

Para la caracterización nutricional, se evaluó la digestibilidad del almidón extraído de los tubérculos de ñame. Se estimaron altos porcentajes de almidón disponible, entre 80 a 90%. El clon venezolano presentó el mayor contenido de almidón resistente (71%), mientras que la fracción más pequeña se encontró en el clon colombiano. En la determinación de la tasa de α -amilólisis, los almidones evaluados en su estado crudo

presentaron una magnitud final de hidrólisis muy baja. Estos valores aumentaron notablemente con el proceso de gelatinización, mostrando magnitudes finales de hidrólisis entre 88 – 96%. Se propone al almidón de clon venezolano como ingrediente para la elaboración de alimentos dirigidos a promover una óptima funcionalidad gastrointestinal, con paso moderado de glucosa a la sangre, por ser el que obtuvo el mayor contenido de almidón disponible y de almidón resistente total, pero a su vez, la menor tasa de hidrólisis y se propone al almidón aislado de los clones D7, D8 y D13 como ingrediente para la elaboración de alimentos dirigidos a deportistas, que requieran un rápido aporte energético, debido a que ellos también poseen alto contenido de almidón disponible y de almidón resistente total, con las mayores tasas de hidrólisis.

Para el establecimiento del banco de germoplasma *in vitro*, se evaluó el efecto de la consistencia física del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS), la concentración de las sales que lo componen y del fotoperiodo, concluyendo que el medio semisólido, con las sales completas de MS y la incubación bajo luz blanca continua, favoreció el crecimiento de las vitroplantas de ñame con un promedio de 3,12 brotes por explante y una longitud promedio de los brotes de 8,5 cm. Por último, el cultivo en medio líquido y la incubación bajo días cortos, permitió inducir la formación de microtubérculos, los cuales pueden ser utilizados como material vegetal de plantación (semilla), con una alta calidad fitosanitaria, producidos masivamente y en menor tiempo, en comparación a lo esperado cuando los tubérculos son cosechados de manera convencional.

Los resultados aquí obtenidos permitieron el resguardo de la biodiversidad del ñame en Venezuela, bajo condiciones controladas y asépticas; la identificación precisa de cada variedad analizada y la posibilidad de recomendar las variedades de mayor calidad nutritiva como los clones, D7, D8, D13 y el clon venezolano para los programas de mejoramiento de este importante cultivo.

Palabras claves: *Dioscorea*, descriptores morfológicos, marcadores moleculares, digestibilidad, cultivo *in vitro*, fotoperiodo, microtubérculos.

II. ABSTRACT

Morphological and nutritional characterization of six yam (*Dioscorea* spp.) accessions and *in vitro* establishment.

Yams (*Dioscorea* spp.) are cultivated on tropicals and sub-tropical world areas. In Venezuela yam cultures are sub-used and the development of this crop is limited by the absence of an appropriate and healthy seed not matter the high food qualities of yam tubers. Some yam cultivars are maintained at the “Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas” (INIA), but there are not studies of the characteristics of these cultivars in order to use them in improvement programs. The main objective of this work was to characterize at morphological, molecular and nutritional levels six yam cultivars (D2, D7, D8, D13, Colombian and Venezuelan) which were donated by INIA. Also the establishment of an efficient *in vitro* culture protocol was aimed with the purpose of create a yam germplasm bank.

A descriptors list for *Dioscorea*, published by the “Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos” (IPGR) and the “Instituto Internacional de Agricultura Tropical” was used to achieve the morphological characterization. This analysis was complemented with the molecular characterization through AFLP markers. Dendrograms were obtained using statistical grouping methods and the yam cultivars were located in six groups. Venezuelan and D7 clones are the ones who share the highest number of morphological traits meanwhile, at molecular level, clones D7 and D8 are very similar. A 77,62 % of polymorphism was obtained which indicate that there are not duplicated samples in this collection. Also this result indicates that they are six different yam cultivars.

Starch digestibility was evaluated from yam tubers in order to assess the nutritional characterization. High available starch percents were obtained (80 to 90%). The Venezuelan clone showed the highest amount of resistant starch (71%), and the Colombian clone showed the smallest one. In relation with the α -amylolysis rate, the uncooked starch values showed a very low final magnitude of hydrolysis. With the gelatinization process these values increased showing final magnitudes between 88 – 96%. The starch from Venezuelan clone tubers can be used as ingredient for foods that promote a good gastro-

intestinal function, with a moderate pass of glucose to blood. These tubers contain the highest amount of available and resistant starches and the slowest hydrolysis rate. The starches obtained from clones D7, D8 y D13 can be used in foods for sports people whom require an immediate energy contribution. These tubers also contain highest amounts of available and resistant starches but they showed the highest hydrolysis rate.

The effect of Murashige y Skoog (MS) medium physical consistence and salt content and the effect of the photo periodical culture conditions were evaluated in order to establish an *in vitro* yam germplasm bank. Results showed that semi-solid MS medium, supplemented with the hole salt content and continuous light conditions promoted yam vitroplantlets growth showing 3,12 buds per explants with an average length of 8,5 cm. Liquid medium cultures maintained under short day light conditions allowed microtubers development. These microtubers can be used as healthy seeds. Their massive production and the shorter time they take to develop in comparison with the tubers produced in conventional field cultures corroborate the importance of the results obtained in this work.

All these results allowed the Venezuelan yam biodiversity to be maintained under controlled and aseptic conditions; allowed the precise identification of each cultivar studied and the possibility of recommend the inclusion of the cultivars with the most appropriate nutritional quality (D7, D8, D13 and Venezuelan clone) in the improvement programs of this important crop.

Key words: *Dioscorea*, morphological descriptors, molecular marker, starch digestibility, *in vitro* culture, photoperiod, microtubers.

III. FINANCIAMIENTO

El desarrollo de esta tesis doctoral fue posible gracias al financiamiento obtenido por el Programa de Estímulo a la Innovación e Investigación (PEII) con el proyecto N° 2012001357 titulado “Identificación molecular de patógenos y propagación masiva de plantas como herramientas útiles para el programa de certificación de semillas en Venezuela”; a la Corporación para el Desarrollo Científico y Tecnológico S.A (CODECYT) con el proyecto titulado “Recuperación, mantenimiento y resguardo del banco de germoplasma de clones de ñame (*Dioscorea* spp.) mediante técnicas de cultivo *in vitro*” y al Centro Nacional de Tecnología Química (CNTQ) por su programa de beca-trabajo.

IV. AGRADECIMIENTOS

Un logro tan importante para mí, como lo es haber culminado mis estudios doctorales, no sería posible sin el apoyo de muchas personas algunas de las cuales no están presentes y otras sé que me acompañan en espíritu. En todo caso y en primer lugar tengo que agradecer a Dios, nuestro Padre, por darme fortaleza y sabiduría durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Agradezco a mis padres por su apoyo sin condiciones y en cada instante, sus palabras de aliento y sus sabios consejos. A mi hermana quien a pesar de estar lejos de mí y de su país, nunca ha estado ausente. A mi abuela por sus oraciones fervorosas para que todo saliera bien y por esa sonrisa y el abrazo que me da fuerzas para continuar en los momentos más duros. A Fernando por ser el esposo ideal, el más comprensivo, consentidor y bello de todos. Agradezco en general a toda mi familia y espero me disculpen por no nombrarlos a todos, pero ellos saben que los tengo en mi corazón.

Gracias infinitas a mi tutora, la Profesora Maira Oropeza, por guiarme en todo este proceso de formación, en pregrado y postgrado, por enseñarme a confiar en mis capacidades, por sus consejos y su apoyo en todo momento.

A los profesores del Jurado por aceptar la lectura del manuscrito de mi tesis y por supuesto, por sus atinadas correcciones y observaciones.

A los profesores del Departamento de Botánica por brindarme la oportunidad de conocer aún más el maravilloso mundo de las plantas, y por brindarme su amistad y apoyo en todo momento; agradecimiento que hago extensivo a todo el personal del IBE, comenzando por su Director el Prof. Ernesto González.

Mi gratitud va también para el Prof. Roshman González, por su gran ayuda en el análisis estadístico de los resultados de mi tesis.

A mis amigas y amigos; para ustedes las palabras de agradecimiento me siguen quedando muy cortas. Son la personificación del cariño sincero y puro, de la amistad sin

medidas y del apoyo incondicional. Espero algún día retribuirles todo lo que han hecho por mí.

Unas palabras en particular para mis amigos, compañeros del laboratorio; gracias por tantos momentos inolvidables, por sus ocurrencias, por las risas a carcajadas, por los chistes malos, por todo lo que aprendí de ustedes, pero sobre todo por quererme tanto y por hacerme sentir como en casa.

A todos, muchísimas gracias.

V. ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	6
HIPÓTESIS	7
CAPÍTULO 1. Aspectos generales del ñame (<i>Dioscorea</i> spp.) y su cultivo.	8
1. ANTECEDENTES	8
1.1 Origen y domesticación	8
1.2 Taxonomía	9
1.3 Características botánicas de las plantas de ñame	10
1.4 Citogenética	13
1.5 Estrategia reproductiva del ñame	14
1.5.1 Propagación por semilla sexual	14
1.5.2 Propagación vegetativa	14
1.6 Enfermedades que atacan al cultivo de ñame en América Latina	16
1.7 Composición química de los tubérculos de ñame	18
1.8 Importancia económica del cultivo de ñame	20
1.9 Usos del ñame	22
CAPÍTULO 2. Caracterización morfológica y molecular de las plantas de ñame (<i>Dioscorea alata</i> L.)	24
1. ANTECEDENTES	25
1.1 Caracterización del germoplasma de ñame	25
1.2 Caracterización morfológica	26
1.2.1 Descriptores morfológicos	27
1.2.2 Listas de descriptores	28
1.3 Caracterización molecular	30
1.3.1 Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).	33
1.3.2 Ventajas y desventajas de los AFLP	34
1.4 Trabajos previos relacionados con la caracterización morfológica y molecular de las plantas de ñame.	35
2. MATERIALES Y MÉTODOS	37
2.1 Establecimiento del banco de germoplasma de ñame	37
2.2 Caracterización morfológica de seis clones de ñame del banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal	38
2.2.1 Análisis estadístico	38
2.3 Caracterización molecular de seis clones de ñame cultivados <i>in vitro</i> .	39
2.3.1 Extracción del ADN	39
2.3.2 Digestión del ADN y ligación de adaptadores	40
2.3.3 Preamplificación y amplificación diferencial	41

2.3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida	43
2.3.5 Tinción de geles con nitrato de plata (AgNO_3)	43
2.3.6 Análisis estadístico	44
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
3.1 Establecimiento del banco de germoplasma de ñame	45
3.2 Caracterización morfológica de seis clones de ñame del banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal	47
3.2.1 Descriptores morfológicos relacionados con el tallo de los seis clones de ñame	48
3.2.2 Descriptores morfológicos relacionados con las hojas de los seis clones de ñame	50
3.2.3 Descriptores morfológicos relacionados con los tubérculos de los seis clones de ñame	54
3.2.4 Análisis estadístico de los resultados obtenidos	55
3.3 Caracterización molecular de seis clones de ñame cultivados <i>in vitro</i> .	61
3.3.1 Extracción de ADN	61
3.3.2 Polimorfismos de los AFLP	63
3.3.3 Análisis estadístico de los resultados obtenidos	68
3.4 Análisis de la relación entre la caracterización morfológica y la caracterización molecular	70
4. CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO 3. Caracterización nutricional de los almidones de ñame (<i>Dioscorea alata</i> L.).	77
1. ANTECEDENTES	77
1.1 Los almidones tropicales y su participación en el mercado mundial.	77
1.2 Usos de los almidones	79
1.3 Aspectos generales del almidón	80
1.3.1 Definición y estructura química	80
1.3.2 Estructura cristalina y granular del almidón	84
1.3.3 Aspectos nutricionales del almidón	87
1.3.3.1 El proceso de digestión	87
1.3.3.2 Digestibilidad del almidón	89
1.3.3.3 Factores que afectan la digestibilidad del almidón	89
1.3.3.4 Clasificación nutricional del almidón	92
1.3.4 Efectos fisiológicos e importancia en la salud del almidón resistente	95
2. MATERIALES Y MÉTODOS	97
2.1 Extracción del almidón de los tubérculos de ñame	97
2.2 Determinación de la humedad de los almidones de los tubérculos de ñame.	98
2.3 Digestibilidad <i>in vitro</i> de los almidones	98

2.3.1 Estimación del contenido de almidón disponible	99
2.3.2 Estimación del contenido de almidón resistente total	100
2.3.3 Estimación de la tasa de α -amilólisis	102
2.4 Análisis estadístico	104
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
3.1 Extracción y determinación de la humedad del almidón de los clones de ñame	105
3.2 Determinación del porcentaje de almidón disponible	107
3.3 Determinación del contenido de almidón resistente total	108
3.4 Determinación de la tasa de α -amilólisis	110
4. CONCLUSIONES	114
CAPÍTULO 4. Micropropagación y microtuberización de seis clones de ñame y su establecimiento en un banco de germoplasma <i>in vitro</i>	115
1. ANTECEDENTES	116
1.1 Cultivo <i>in vitro</i>	116
1.2 Micropropagación	117
1.2.1 Ventajas de la micropropagación	119
1.2.2 Problemas comunes durante la micropropagación	120
1.2.2.1 El enraizamiento	120
1.2.2.2 Hiperhidratación	120
1.2.2.3 Contaminación	121
1.2.2.4 Oxidación fenólica	122
1.2.2.5 Especies recalcitrantes	123
1.2.3 Micropropagación de ñame	123
1.3 Microtuberización	126
1.3.1 Microtuberización de ñame	127
1.4 Factores que afectan la micropropagación y la microtuberización de ñame	128
1.4.1 Selección del explante	128
1.4.2 Medios de cultivo: concentración de las sales que lo componen y su consistencia física	129
1.4.3 Reguladores de crecimiento en el medio de cultivo	132
1.4.4 Concentración de sacarosa en el medio de cultivo	133
1.4.5 Fotoperiodo	134
1.5 Bancos de germoplasma <i>in vitro</i>	135
1.6 Ventajas e inconvenientes de la conservación <i>in vitro</i>	137
1.7 Bancos de germoplasma <i>in vitro</i> de ñame	138
2. MATERIALES Y MÉTODOS	141
2.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de las plantas que se utilizaron como fuente de explante para la micropropagación de los clones de ñame.	141

2.2 Micropropagación de los clones de ñame	141
2.3 Microtuberización de los clones de ñame	142
2.4 Análisis estadístico	144
2.5 Establecimiento del banco de germoplasma <i>in vitro</i>	145
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	146
3.1 Establecimiento <i>in vitro</i> de las plantas que se utilizaron como fuente de explante para la micropropagación de seis clones de ñame	146
3.2 Micropropagación de los clones de ñame	148
3.3 Microtuberización de los clones de ñame	166
4. CONCLUSIONES	179
INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS	183
CONCLUSIÓN GENERAL	190
PERSPECTIVAS FUTURAS	191
BIBLIOGRAFÍA	192

VI. ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	Pág.
Tabla 1. Principales países productores de ñame (<i>Dioscorea</i> spp.).	21
Tabla 2. Análisis de las combinaciones de iniciadores empleados en la amplificación diferencial.	42
Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los iniciadores.	42
Tabla 4. Algunos descriptores de pasaporte reportados para los clones de ñame que conforman el banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.	45
Tabla 5. Descriptores relacionados con los tallos de los seis clones de ñame.	50
Tabla 6. Descriptores relacionados con las hojas de los seis clones de ñame.	51
Tabla 7. Descriptores relacionados con los tubérculos de los seis clones de ñame.	55
Tabla 8. Análisis de componentes principales.	56
Tabla 9. Valores propios (autovalores) de las variables estudiadas representadas en los tres primeros componentes principales.	57
Tabla 10. Índice de similitud basado en el coeficiente de Jaccard para los seis clones de ñame estudiados.	60
Tabla 11. Valores de concentración y pureza de ADN de seis clones de ñame y dos variedades de papa.	62
Tabla 12. Polimorfismos en los clones de ñame obtenidos con 15 combinaciones de iniciadores AFLP.	65
Tabla 13. Índice de similitud basado en el coeficiente de Jaccard para seis genotipos de ñame.	69
Tabla 14. Índice de similitud basado en el coeficiente de Jaccard para seis genotipos de ñame considerando sus características morfológicas y moleculares.	72
Tabla 15. Composición química de los almidones de papa, batata, yuca y ñame	84
Tabla 16. Clasificación nutricional del almidón	92
Tabla 17. Importancia del almidón resistente como alimento funcional	95
Tabla 18. Cantidad de almidón obtenido y rendimiento de extracción de los almidones de los clones de ñame.	106
Tabla 19. Humedad de los almidones aislados a partir de seis clones de ñame.	106
Tabla 20. Contenido de almidón disponible y de almidón resistente total de los almidones aislados de seis materiales de ñame.	109
Tabla 21. Velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis <i>in vitro</i> de los almidones de seis clones de ñame	111
Tabla 22. Protocolo de desinfección de los segmentos nodales utilizados para el establecimiento del plantel	141
Tabla 23. Definición de las variables dependientes e independientes	144
Tabla 24. Índices de contaminación de segmentos nodales usados como explantes	146
Tabla 25. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo sobre el número de brotes de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.	156

Tabla 26. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo sobre la longitud de los brotes (en centímetros) de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.	156
Tabla 27. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el número de raíces de las vitroplantas de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.	162
Tabla 28. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre la longitud de las raíces (en centímetros) de las vitroplantas de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.	162
Tabla 29. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el peso fresco de las raíces (en gramos) de las vitroplantas de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.	163
Tabla 30. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el número de microtubérculos (NM) de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.	170
Tabla 31. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el diámetro de microtubérculos (en centímetros) de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.	171
Tabla 32. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el peso fresco de microtubérculos (en gramos) de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.	174
Tabla 33. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el peso seco de microtubérculos (en gramos) de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.	175

VII. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
Figura 1. Morfología de <i>Dioscorea alata</i> .	12
Figura 2. Fases fenológicas del ñame.	15
Figura 3. Etapas de la técnica de AFLP.	34
Figura 4. Tubérculos de (A) clon D2 y (B) clon D13, luego de dos meses guardados en bolsas de papel bajo condiciones de invernadero.	46
Figura 5. Plantas de ñame ubicadas en el vivero del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.	48
Figura 6. Detalle de la presencia/ausencia de alas en el tallo maduro y el color de dichas prolongaciones en las plantas de ñame.	49
Figura 7. Forma de la hoja del clon D8, clon D2 y clon venezolano.	52
Figura 8. Detalle del color del pecíolo de las hojas de clon D2, clon D7 y clon D13.	53
Figura 9. Color de la pulpa de los tubérculos de clon D2, clon venezolano y clon colombiano.	54
Figura 10. Distribución de los seis clones de ñame estudiados sobre el primero y segundo componente principal en la caracterización morfológica.	58
Figura 11. Dendrograma obtenido por el análisis de conglomerados (basado en el coeficiente de Jaccard y con el método de agrupamiento centroide) de 43 descriptores morfológicos estudiados en seis clones de ñame.	60
Figura 12. Integridad del ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D13, CC, CV) y dos variedades de papa ('arbolona negra' AN y 'granola' G) en un gel de agarosa al 0,8 %. PM. Marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI+ HindIII.	63
Figura 13. Registro fotográfico de electroforesis de los productos de amplificación diferencial por PCR con 5 pares de iniciadores (Ase 01-Taq 02; Ase 04-Taq 14; Ase 06-Taq 09; Ase 06-Taq 16; Ase 08-Taq 02), ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D13, CC, CV) y ADN de papa, var. 'Arbolona negra' (AN).	66
Figura 14. Registro fotográfico de electroforesis de los productos de amplificación diferencial por PCR con 5 pares de iniciadores (Ase 08-Taq 03; Ase 08-Taq 05; Ase 08-Taq 07; Ase 08-Taq 09; Ase 08-Taq 16), ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D13, CC, CV) y ADN de papa, var. 'Arbolona negra' (AN).	67
Figura 15. Registro fotográfico de electroforesis de los productos de amplificación diferencial por PCR con 5 pares de iniciadores (Ase 09-Taq 02; Ase 09-Taq 03; Ase 09-Taq 05; Ase 09-Taq 12; Ase 09-Taq 14), ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D13, CC, CV) y ADN de papa, var. 'Arbolona negra' (AN).	68
Figura 16. Dendrograma obtenido del análisis de conglomerados (basado en el coeficiente de Jaccard y con el método de agrupamiento UPGMA) de 219 bandas amplificadas generadas con 15 combinaciones de iniciadores AFLP.	70
Figura 17. Dendrograma obtenido del análisis de conglomerados de la asociación de caracteres morfológicos y moleculares.	73
Figura 18. Estructura química del polímero de amilosa.	81
Figura 19. Estructura química del polímero de amilopectina.	82
Figura 20. Arreglo de las dobles hélices de los cristales tipo A y B en los gránulos de almidón.	85

Figura 21. Fotomicrografías de gránulos de almidón nativo de <i>Dioscorea bulbifera</i> .	87
Figura 22. Detalle del color de la pulpa de los tubérculos de los clones de ñame. A. clon venezolano, B. clon D2, C. clon D7, D. clon D8, E. clon D13 y F. clon colombiano.	107
Figura 23. Cinética de hidrólisis <i>in vitro</i> de los almidones de los clones venezolano, D2, D7, D8, D13 y colombiano extraídos a escala laboratorio.	112
Figura 24. Diseño experimental para evaluar el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo sobre la micropropagación y microtuberización de los clones de ñame.	143
Figura 25. Segmentos nodales de clon D13, (A y B) evidencia de la oxidación de los tejidos por liberación de compuestos fenólicos y (C y D) contaminación por hongos.	147
Figura 26. Clones de ñame establecidos <i>in vitro</i> luego de un mes de cultivados los segmentos nodales desinfectados: (A) clon D2, (B) clon D7, (C) clon D8, (D) clon colombiano, (E) clon venezolano.	147
Figura 27. Detalle de la formación de callo en las vitroplantas de (A) clon D2, (B) clon D7, (C) clon D8, (D) clon colombiano y (E) clon venezolano, a las dos semanas de haber sido cultivadas en medio semisólido, con la adición de 1 mg/l BA y 0,5 mg/l de ANA e incubadas bajo luz blanca continua.	149
Figura 28. Vitroplantas de clon venezolano cultivadas en medio semisólido (A) y en medio líquido (B) con severos problemas de oxidación y oscurecimiento del medio de cultivo.	150
Figura 29. Vitroplantas de clon colombiano cultivadas en medio semisólido (A) y en medio líquido (B), sin señales de oxidación ni cambios de coloración en el medio de cultivo.	150
Figura 30. Escala para medir niveles de oxidación en medios de cultivo. Tomada de (Quintero y Jarma, 2000).	151
Figura 31. Vitroplantas de (A) clon D2, (B) clon D7, (C) clon D8, (D) clon colombiano y (E) clon venezolano, de dos meses de edad, micropropagadas en medio semisólido suplementado con 1 mg/l de BA y 0,5 mg/l de ANA e incubadas bajo luz blanca continua.	152
Figura 32. Vitroplantas de (A) clon D2, clon D7, clon D8, (B) clon colombiano y (C) clon venezolano, de dos meses de edad, micropropagadas en medio líquido suplementado con 1 mg/l de BA y 0,5 mg/l de ANA e incubadas bajo luz blanca continua.	153
Figura 33. (A) Vitroplantas de clon colombiano mostrando un microtubérculo entre las raíces. Microtubérculos de dos meses de edad (D), formados en las axilas de las hojas (B) con numerosas raíces (C). Obtenidos en vitroplantas cultivadas en medio sólido, con las sales completas de MS e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz.	168
Figura 34. Microtubérculos de (A) clon colombiano, (B) clon D8, (C) clon D7, (D) clon D2 y (E) clon venezolano, obtenidos a los 6 meses de cultivo en vitroplantas cultivadas en medio líquido e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz.	169
Figura 35. Microtubérculos de clon D8 obtenidos después de ocho meses de cultivo, en vitroplantas cultivadas en medio líquido, con 1/5 de las sales de MS e incubadas bajo luz blanca continua.	172

- Figura 36.** Microtubérculos de clon colombiano obtenidos después de ocho meses de cultivo, en vitroplantas cultivadas en medio líquido, con 1/5 de las sales de MS e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz. 172
- Figura 37.** Microtubérculos de clon D2 obtenidos después de ocho meses de cultivo, en vitroplantas cultivadas en medio líquido, con 1/5 de las sales de MS e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz 173
- Figura 38.** Microtubérculos de clon D7 obtenidos después de ocho meses de cultivo, en vitroplantas cultivadas en medio líquido, con 1/5 de las sales de MS e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz. 173
- Figura 39.** Microtubérculos de clon venezolano obtenidos después de ocho meses de cultivo en vitroplantas cultivadas en medio líquido, con las sales completas de MS e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz 173

VIII. SIGLAS Y ABREVIATURAS

cm	Centímetros
µm	Micrómetros
nm	Nanómetros
g	Gramos
g/l	Gramos por litro
kg	Kilogramos
mg	Miligramos
mg/l	Miligramos por litro
ng/µl	Nanogramos por microlitro
u/µl	Unidades por microlitro
W	Watts
V	Voltios
mA	Miliamperios
msnm	Metros sobre el nivel del mar
°C	Grados centígrados
rpm	Revoluciones por minuto
ppm	Partes por millón
p/v	Peso/volumen
v/v	Volumen/volumen
YMV	Virus del mosaico del ñame
CMV	Virus del mosaico del pepino
PVX	Virus X de la papa
FONAIAP	Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
APG III	Angiosperm Phylogeny Group
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
IITA	Instituto Internacional de Agricultura Tropical
IPGRI	Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos
IDIAP	Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá
PBA	Programa Colombiano de Biotecnología Agrícola
LMV	Laboratorio de Mejoramiento Vegetal
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
AFLP	Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados
SSR	Secuencias simples repetidas o microsatélites
GI	Índice Genotipo
UPGMA	Unweighed Pair Group Meted Average
MVSP	Multi Variate Statistical Package
ANOVA	Análisis de varianza
LSD	Diferencias mínimas significativas de Fisher
ACP	Análisis de componentes principales

NH_4COOH	Acetato de amonio
EtOH	Etanol
AgNO_3	Nitrato de plata
Na_2CO_3	Carbonato de sodio
NaHSO_3	Bisulfito de sodio
KOH	Hidróxido de potasio
NaOH	Hidróxido de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
DNS	Ácido dinitrosalicílico
ADR	Almidón de digestión rápida
ADL	Almidón de digestión lenta
AR	Almidón resistente
MS	Murashige y Skoog
ANA	Ácido Naftalenacético
BA	Benciladenina
K	Cinetina

INTRODUCCIÓN

Todos los órganos de las plantas, sin excepción alguna, han sido utilizados desde épocas prehistóricas para la alimentación de los seres humanos. Entre estos órganos, las raíces y tubérculos juegan un papel esencial por cuanto son una fuente muy importante de calorías, proteínas y fibras dietéticas, con la ventaja de que su composición lipídica es prácticamente despreciable (Montaldo y col., 1991).

Las raíces y tubérculos son alimentos básicos de la dieta de los pobladores de América Latina, África y Asia. Los más conocidos por sus valores nutricionales son producidos en climas tropicales y han adquirido una gran importancia como alimento para la población, particularmente de escasos recursos, tanto rural como urbana (Scott y col., 2000).

A diferencia de los frutales y cereales, las raíces y tubérculos enfrentan problemas en su comercialización, debido entre otros factores, a la falta de promoción del consumo del rubro, al escaso desarrollo tecnológico del producto cosechado y a su relativamente baja calidad, puesto que los agricultores suelen seleccionar lo mejor de sus cosechas para garantizar el establecimiento exitoso de su nuevo material de siembra (León, 1987).

Las posibilidades de fomentar el uso y consumo de las raíces y tubérculos van a depender en gran medida del conocimiento que se disponga sobre sus principales componentes químicos y de las características físicas, nutricionales y funcionales que se les atribuyen para orientar sus posibles usos y aplicaciones (Scott y col., 2000).

En Venezuela, los rubros autóctonos del grupo de los tubérculos como el ñame (*Dioscorea alata*), el ocumo (*Xanthosoma sagittifolium*) y el mapuey (*Dioscorea trifida*), son considerados recursos alimentarios que representan la sostenibilidad de la economía de las poblaciones rurales de las distintas regiones donde se cultivan, y que históricamente forman parte de la dieta de sus poblaciones originarias (León, 1987). Estos rubros adquieren un gran valor económico y estratégico para el sector agroindustrial, como posibles materias primas para la obtención de almidones y harinas (Montaldo y col., 1991). Otras investigaciones demuestran que las propiedades funcionales que poseen estos tubérculos, son compatibles para la producción agroindustrial de diversos tipos de

alimentos de consumo masivo (Rincón y col., 2000; Pérez y Pacheco, 2005; Pacheco y Techeira, 2009).

El ñame es una monocotiledónea anual, de hábito trepador, de hojas simples y generalmente acorazonadas; bajo tierra desarrollan un tubérculo color café el cual varía de forma y tamaño según la especie. Desde el punto de vista taxonómico, el ñame pertenece a la familia Dioscoreaceae, la cual comprende entre 6 a 10 géneros, siendo el género *Dioscorea* el de mayor distribución a nivel mundial y el más importante en cuanto a número de especies. Hasta el momento se conocen cerca de 600 especies de este género, de las cuales solo 12 son cultivadas a nivel comercial (Salazar y Beltrán, 2003).

No todas las especies de ñame se cultivan con el propósito de ser consumidas como alimentos; se encuentran por ejemplo, algunas especies silvestres que presentan entre sus metabolitos secundarios, alcaloides, saponinas y sapogeninas, de interés para la industria farmacéutica, pero que en altas concentraciones podrían ser tóxicos (González, 2012).

Valga decir, que prácticamente todas estas especies, tanto las destinadas al consumo alimentario como aquellas usadas como medicamentos naturales, reciben el mismo nombre vulgar de “ñame”, siendo *Dioscorea alata* L. la especie de ñame más cultivada en la región neotropical. Esta especie, originaria del sureste asiático, se cultiva en América desde la llegada de los primeros barcos españoles cargados de esclavos africanos (Álvarez, 2000).

En toda la diversidad de plantas de ñame se pueden encontrar genotipos con un alto valor agronómico, que se pueden utilizar en los programas de mejoramiento genético; sin embargo, en muchas ocasiones el conocimiento que se tiene de la organización genética y la relación existente entre el material disponible es escaso, lo que impide su uso en dichos programas de fitomejoramiento. También, en las mismas colecciones de germoplasma, se pueden encontrar materiales duplicados, lo cual conlleva a una sobreestimación de la diversidad existente (Aguilar, 2012).

Según Franco e Hidalgo (2003), si se quiere medir la variabilidad de una colección se puede realizar una caracterización morfológica. Para esto se recurre al uso de listas de descriptores bien definidos, altamente heredables y cuya expresión es detectada a simple

vista (Torres, 2010). Sin embargo, la expresión de las características morfológicas puede verse afectada por el ambiente. Por esta razón, se suele complementar con la caracterización molecular utilizando marcadores moleculares que poseen un polimorfismo elevado, no requieren del conocimiento previo del genoma y su expresión no se ve afectada por condiciones ambientales (Vos y col., 1995).

La caracterización morfológica y molecular tiene como finalidad proteger los recursos genéticos que generalmente se pierden por mal manejo en el cultivo; por ejemplo, el reemplazo de variedades originarias de una región por variedades mejoradas. Mediante la caracterización y evaluación del germoplasma de ñame se pretende establecer analogías y diferencias entre accesiones, e identificar el material promisorio que será de utilidad al momento de definir estrategias de manejo de este cultivo. Además se genera información científica desde el punto de vista botánico y molecular aportando conocimientos útiles para fitomejoradores, promotores campesinos y agricultores conservacionistas, que permitan el óptimo aprovechamiento de estos recursos (Bustamante y col., 2001).

La caracterización nutricional de los almidones de las especies tuberosas, también es un parámetro de gran importancia a evaluar. Muchas especies de *Dioscorea* presentan excelentes niveles nutricionales para la dieta alimentaria y procesos sencillos de cocción para el consumo humano, por lo que son una fuente de almidón y proteínas y en una menor proporción de lípidos, vitaminas y minerales. El almidón es el carbohidrato principal de las plantas superiores y constituye la principal fuente de consumo de carbohidratos en la dieta de los seres humanos (Bonilla y Hernández, 2012).

El almidón presenta un conjunto de características funcionales adecuadas a una determinada aplicación. Estas características derivan de las propiedades físico-químicas de sus gránulos. En las últimas décadas, se han hecho esfuerzos considerables para manipular la digestibilidad del almidón, teniendo como objetivo lograr un incremento en el nivel de almidón resistente. Se entiende como “almidón resistente” a los elementos de almidón que escapan a la hidrólisis en el intestino delgado y por lo tanto están disponibles para la fermentación en el colon. Según Englyst y col. (1992), por su susceptibilidad a las enzimas

amilolíticas, el almidón se puede clasificar en almidón rápidamente digerible (RDS), almidón de digestión lenta (SDS) y almidón resistente (RS) (Hickman y col., 2009).

Finalmente, para poder establecer un banco de germoplasma *in vitro* debidamente caracterizado, debemos tomar en cuenta que el ñame se reproduce principalmente de forma vegetativa mediante el fraccionamiento de los tubérculos, siendo la principal causa de la poca disponibilidad de material de siembra, ya que alrededor del 30% de los tubérculos son guardados para reproducción. Además, a consecuencia de la reproducción vegetativa, algunas enfermedades son transferidas de un ciclo a otro y de una localidad a otra, incidiendo sobre la productividad del cultivo (Borges y col., 2009b). Para superar esta situación problemática, se han utilizado métodos biotecnológicos como la propagación mediante cultivos *in vitro*, la cual permite la producción masiva de plántulas y semillas de calidad, libres de patógenos, a bajo costo, en espacio reducido, en menor tiempo, bajo condiciones controladas y con alternativas promisorias de establecimiento, conservación e intercambio de material vegetal en bancos de germoplasma (Bonilla y Hernández, 2012; González, 2012).

La micropropagación o propagación clonal es una de las aplicaciones más generalizadas del cultivo *in vitro*. A partir de un fragmento (explante) de la planta madre, obtenido de tallos con yemas o de meristemas aislados, se logra una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones (Borges y col., 2009a). Otro de los mecanismos utilizados para la propagación del ñame es la microtuberización, que permite la producción de microtubérculos los cuales pueden ser usados como semillas libres de patógenos, sin la necesidad de hacer operaciones costosas para recolectar ñame en el campo (Balogun, 2009).

La inducción y crecimiento de microtubérculos en *Dioscorea* está bajo el control de factores ambientales e intrínsecos. La temperatura y el fotoperiodo están documentados como factores ambientales determinantes (Posthumus, 2000; Vaillant y col., 2005). Por su parte, entre los factores intrínsecos claves para la microtuberización, pueden citarse: la consistencia física, los reguladores de crecimiento, la concentración de sacarosa y el suplemento de nitrógeno en el medio de cultivo. Sin embargo, el papel de estos factores

considerados desde el punto de vista individual, no ha sido bien establecido. Puede afirmarse que la micropropagación y la microtuberización son parte de una tecnología moderna con un excelente futuro para el cultivo del ñame (Ondo y col., 2010).

Los cultivos de raíces y tubérculos desempeñarán una función múltiple en la alimentación del mundo en desarrollo durante las próximas décadas. Se estima que para el año 2020, más de dos mil millones de personas de Asia, África y América Latina dependerán de las raíces y tubérculos como fuente de alimento, forraje o ingresos económicos. El valor de las raíces y tubérculos reside en su capacidad de producir más energía digerible por hectárea por día, que cualquier otro producto básico, y en su capacidad de seguir produciendo en condiciones donde otros cultivos fracasan (Borges y col., 2009a). En este sentido, en esta investigación se propone caracterizar a nivel morfológico, molecular y nutricional seis clones de ñame (*Dioscorea* spp.) y establecer su cultivo *in vitro* con la finalidad de resguardar tan promisorio rubro y utilizarlo en beneficio de la población venezolana.

OBJETIVOS

Objetivo general

Establecer un banco de germoplasma *in vitro* de ñame (*Dioscorea* spp.).

Objetivos específicos

1. Caracterizar a nivel morfológico y molecular seis materiales de ñame.
2. Estimar la digestibilidad *in vitro* de los almidones aislados de los tubérculos de estos seis materiales.
3. Establecer el banco de germoplasma *in vitro* de ñame en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal con la inclusión de estos seis materiales caracterizados.

HIPÓTESIS

Si se tiene como propósito establecer un banco de germoplasma *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.), entonces es necesario conocer entre otros aspectos, sus principales caracteres morfológicos, nutricionales y moleculares, así como optimizar su proceso de micropropagación y microtuberización.

CAPITULO 1. Aspectos generales del ñame (*Dioscorea* spp.) y su cultivo.

El ñame es el nombre común con el cual se designan varias especies del género *Dioscorea*. Esta planta es cultivada por pequeños y medianos agricultores en regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo, constituyendo una fuente cada vez más importante de alimento, empleo rural e ingreso para la creciente población en los países en desarrollo. En Venezuela, el desarrollo extensivo del cultivo del ñame ha estado limitado entre otras causas, por la poca disponibilidad de material de plantación con óptima calidad fisiológica y sanitaria. No obstante, en los últimos años el cultivo del ñame ha presentado un incremento considerable y está presente en el desarrollo de la agricultura familiar. En este capítulo se hace una amplia revisión bibliográfica con el objetivo de dar a conocer las potencialidades de este tubérculo, así como recopilar información que pueda resultar de interés a especialistas que se inicien en el estudio de este cultivo y a productores motivados por el mismo. Dentro de los aspectos relacionados con el cultivo del ñame que se incluyen en este capítulo, se destaca su origen, clasificación taxonómica, características botánicas, citogenética, estrategias reproductivas, plagas y enfermedades, composición química de sus tubérculos, importancia económica y los usos más frecuentes de este cultivo.

1. ANTECEDENTES**1.1 Origen y domesticación**

El género *Dioscorea* está considerado entre los más primitivos de las angiospermas y se ha diferenciado en especies del viejo y nuevo mundo. Se cree que los ñames se originaron en las áreas tropicales de tres continentes, por ejemplo *Dioscorea alata* y *D. esculenta* son originarios del sureste de Asia; *D. rotundata*, *D. cayenensis* y *D. dumetorum*, se originaron en África occidental y *D. trifida* es oriunda de Suramérica. La presencia de *Dioscorea* spp. en estas áreas precede a la historia humana y la domesticación de las diferentes especies parece haber sido por los habitantes primigenios de cada una de las regiones antes mencionadas (Bhattacharjee y col., 2011).

La forma ancestral del ñame consistió principalmente de plantas con enraizamiento profundo y algunas con enraizamiento superficial. Los hombres seleccionaron estas últimas debido a su facilidad de cosecha. Los primeros colectores, alrededor de 2000 años a.C.,

notaron que la remoción cuidadosa de los tubérculos le permitía a la planta recuperarse y producir otro tubérculo (González, 2012). Burkill (1960) sugirió que los ñames, junto con las aráceas, fueron las primeras plantas domesticadas por las comunidades de pescadores. Estas comunidades dependían del mar para cubrir sus necesidades alimenticias, pero incursionaban en la costa para buscar otros productos comestibles. Las secciones de los tubérculos no consumidos enraizaron y dieron origen a las plantas cercanas a los pueblos de pescadores.

El género *Dioscorea* es uno de los seis géneros pertenecientes a la familia Dioscoreaceae y agrupa aproximadamente 600 especies, muchas de ellas de elevado potencial económico. Según González (2012) las especies comestibles y de valor comercial pertenecientes a este género son: *D. alata* L. (conocida como gran ñame, ñame de agua o ñame alado), *D. rotundata* Poir. (ñame blanco de Guinea), *D. cayenensis* Lam. (ñame amarillo o ñame amarillo de Guinea), *D. esculenta* (Lour.) Burkill (ñame chino, batata de China o ñame menor), *D. dumetorum* (Kunth) Pax (ñame amargo o ñame trifoliado), *D. bulbifera* L. (ñame aéreo), *D. trifida* L. (mapuey), *D. opposita* Auct. (ñame canela) y *D. japonica* Thunb.

1.2 Taxonomía

A continuación se presenta la ubicación del cultivo de ñame en un sistema jerárquico de categorías taxonómicas propuesto por Cronquist (1981).

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Dioscoreales

Familia: Dioscoreaceae

Género: *Dioscorea*

Especies: varias

De acuerdo con Álvarez (2000), el género *Dioscorea* es muy amplio y puede ser subdividido en cinco secciones:

- a) Enantiophyllum: *D. rotundata*, *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. opposita* y *D. japonica*.
- b) Combilium: *D. esculenta*

- c) Lasiophyton: *D. dumetorum*, *D. hispida* y *D. pentaphylla*
- d) Opsophyton: *D. bulbifera*
- e) Macrogynodium: *D. trifida*.

Es de hacer notar que de acuerdo al sistema de clasificación APG III (Angiosperm Phylogeny Group), publicado en 2009 y basado en datos moleculares, la familia Dioscoreaceae pertenece al orden Dioscoreales del clado Monocotiledóneas, lo cual permite validar las clasificaciones anteriores que se fundamentaban en criterios principalmente morfológicos.

1.3 Características botánicas de las plantas de ñame

El género *Dioscorea* está constituido por plantas anuales, monocotiledóneas, herbáceas y generalmente dioicas. Sus tallos crecen en forma de enredadera y la dirección que tomen durante su crecimiento, hacia la derecha o hacia la izquierda, es una característica peculiar para pertenecer a una sección particular dentro del género. Las especies de la sección *Enantiophyllum* enrollan sus tallos hacia la derecha (en el sentido de las agujas del reloj) mientras que aquellas pertenecientes a las secciones *Combilium*, *Lasiophyton*, *Opsophyton* y *Macrogynodium* enrollan sus tallos hacia la izquierda (Bhattacharjee y col., 2011).

Los tallos de ñame pueden alcanzar más de tres metros, con formas cuadrangulares, aladas o redondas y con colores desde verde, morado, rojizo hasta marrón. En muchas especies, los tallos tienen espinas (por ejemplo *D. cayenensis* y *D. esculenta*) y alas (*D. alata*) lo cual facilita el hábito trepador mientras que también disminuye la depredación animal (Dumet y Ogunsola, 2008).

La planta de ñame posee un sistema radical fibroso poco ramificado y poco profundo, concentrado en los primeros 30 cm de profundidad del suelo, raramente llegando hasta un metro de profundidad. Después del brote, las raíces se desarrollan rápidamente y alcanzan entre tres a cuatro metros alrededor de la planta. El ñame posee tres tipos de raíces adventicias: (1) raíces originadas de la estructura tipo cormo en la base del tallo, cuya función es absorber los minerales, nutrientes y agua del suelo, (2) raíces que se originan de los tubérculos y (3) raíces procedentes de los nudos inferiores de las plantas en crecimiento (Bhattacharjee y col., 2011; González, 2012).

El cormo es una estructura que se forma en las primeras etapas de la planta. Se localiza en la base del tallo y aparece después de los primeros brotes que conformarán el follaje. Una vez desarrollado el cormo, este dará origen a las raíces principales de la planta y al tubérculo; es decir, esta estructura es el punto de unión entre el tallo, el tubérculo y las raíces. El cormo cuando es poco desarrollado puede permanecer adherido al tubérculo después de la cosecha, como sucede en las plantas de *D. alata*, o puede separarse una vez que esté bien diferenciado, para dar origen a una nueva producción de tubérculos como en el caso de las plantas de *D. rotundata* (González, 2012).

Las hojas de ñame tienen una gran variabilidad en cuanto a forma, tamaño y color entre una especie y otra e incluso entre individuos de una misma especie. Generalmente, las hojas son simples, cordadas o acuminadas pero en algunas especies también pueden ser lobadas o palmadas con ápices puntiagudos. El color puede variar desde verde claro hasta verde oscuro, incluso con diferentes colores en las nervaduras y en el pecíolo. Algunas veces las hojas presentan matices de color morado debido a su alto contenido en antocianinas. El área laminar en las especies cultivadas es cerca de 50-200 cm². El pecíolo de las hojas es largo y puede ser alado o espinoso. La disposición foliar en los tallos se describe usualmente como opuesta en algunas especies y alterna en otras; en ocasiones las hojas superiores en una misma planta son alternas y las inferiores son opuestas (Jiménez y Hernández, 2009).

La floración en la mayoría de los ñames comestibles se ha reportado como dispersa, irregular y escasa; cuando ocurre el brote de las flores, éstas son pequeñas y poco coloridas. Las flores masculinas se producen en panículas en las axilas de las hojas; consisten de un cáliz con tres sépalos y una corola con tres pétalos y presentan entre tres a seis estambres. Las flores femeninas se dan en forma de espiga; están conformadas por tres sépalos, tres pétalos y un ovario ínfero, trilocular (Dumet y Ogunsola, 2008). Bhattacharjee y col., (2011) comenta que las flores de todas las especies de *Dioscorea* son entomófilas, su delicada esencia atrae a insectos cuyas especies aún no han sido identificadas.

El fruto es una cápsula dehiscente con tres lóculos, de 1-3 cm de longitud y de color verde en su etapa inicial y marrón al madurar. En cada lóculo de la cápsula se encuentran

dos semillas pequeñas con estructuras aladas para la dispersión por el viento (Brenes, 2010).

Los tubérculos subterráneos pueden ser solitarios o en grupos y varían mucho en forma y tamaño dependiendo de la especie. Los hay en forma esférica, fusiforme y a menudo con ramificaciones muy cortas, pueden llegar a pesar entre 0,5 a 2 kg cada uno. La superficie del tubérculo es rugosa, a veces con raicillas. Su pulpa es uniforme, compacta, cremosa y varía de color blanco, amarillo e incluso morado según la especie. El tubérculo tiene la capacidad de formar su sistema caulinar a partir de una capa de células meristemáticas localizadas en la corteza. Esta característica se aprovecha para la propagación vegetativa de la especie a partir de secciones de tubérculos (Álvarez, 2000). Las especies pertenecientes a la sección *Enantiophyllum* por lo general producen entre uno a tres tubérculos grandes, mientras que *D. esculenta* (Combilium) produce entre 5 a 20 tubérculos, *D. dumetorum* (Lasiophyton) entre 3 a 12 tubérculos y *D. trifida* (Macrogynodium) produce muchos tubérculos pero muy pequeños (Bhattacharjee y col., 2011).

Algunas especies como *D. bulbifera*, *D. alata*, *D. opposita* y *D. japonica* producen tubérculos aéreos o bulbillos en las axilas de las hojas cuando la planta alcanza cierto grado de madurez. Son similares a los tubérculos subterráneos, su centro es un tejido de almacenamiento constituido por gránulos de almidón. Su coloración varía de gris a pardo oscuro, pueden tener formas angulares, redondeadas o arriñonadas y pueden pesar desde 3 g hasta más de 1 kg. Los bulbillos pueden ser tóxicos en algunas especies mientras que en otras son de textura fina y de sabor agradable (Rodríguez, 2000).

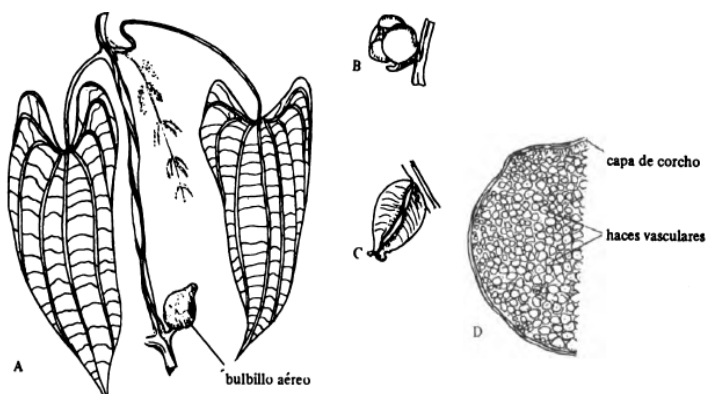


Figura 1. Morfología de *Dioscorea alata*. A. rama florífera con bulbillo aéreo; B. flor estaminada; C. flor pistilada; D. corte transversal del tubérculo. Tomado de León (1987).

1.4 Citogenética

Dioscorea es uno de los géneros más difíciles para estudios de citogenética, debido a lo pequeño de las flores y de los cromosomas en algunas especies, por lo tanto hasta el momento solo se ha reportado el conteo cromosómico de 55 especies. Sin embargo, el género ofrece un modelo atractivo para la investigación de eventos de ploidía y evolución cromosómica en especies cultivadas y silvestres en relación con su naturaleza dioica, propagación sexual o vegetativa y el proceso de domesticación (Egesi y col., 2002).

Según Aguilar (2012) en un estudio cromosómico del ñame se podría afirmar que el análisis del cariotipo en cuanto a características estructurales y cuantitativas es importante en investigaciones taxonómicas y evolutivas, puesto que los cromosomas no son un sistema estático, sino que están en constante cambio como resultado del proceso de evolución. Esta variación se expresa en características como: número, forma y tamaño de los cromosomas y hace frecuente y normal la existencia de variación cariotípica interespecífica.

El número base de cromosomas de las especies de ñame es controversial, aunque se ha reportado como $x = 10$ o $x = 9$, con una alta frecuencia de especies poliploides. Las especies tetraploides son las más frecuentes, seguido por las especies diploides ($2x$), hexaploides ($6x$) y octaploides ($8x$). El número base de cromosomas $x = 10$ (encontrado en todas las especies asiáticas) está presente solamente en 52% de las especies africanas y 13% de las especies americanas estudiadas hasta el momento (Bousalem y col., 2006). Según Nemorin y col. (2013) *Dioscorea alata* es una especie poliploide con un nivel de ploidia que va desde diploide ($2n = 2x = 40$) hasta tetraploide ($2n = 4x = 80$). Se encontró que la poliploidia de *D. alata* habría aparecido producto de nuevas reestructuraciones o hibridaciones entre poliploides con distintos números básicos.

Es importante para los productores de ñame determinar el estado de ploidia de los clones antes de que ellos puedan ser utilizados en programas de entrecruzamiento. Estos datos son esenciales para el cruce sexual de los ñames, lo que permitirá la manipulación de la ploidia en cruces intraespecíficos, reproducción y conservación de la especie y para elucidar la filogenia, el origen del ñame y la evolución del género *Dioscorea* (Egesi y col., 2002).

1.5 Estrategia reproductiva del ñame

Es muy probable que la reproducción del ñame estuviera centrada en el método sexual antes de que el hombre iniciara su domesticación. En esa época, una planta femenina podía producir muchas semillas, lo cual hubiese resultado útil para sobrevivir durante la colonización de ambientes temporales o inestables. Posteriormente, a través de la domesticación, el ñame redujo su capacidad para producir semillas sexuales. Paulatinamente, la propagación vegetativa prevaleció porque las plantas fueron seleccionadas bajo los criterios de tamaño y forma del tubérculo, facilidad de cosecha y buenas características organolépticas. La supervivencia de las plantas comenzó a depender más del hombre, a la vez que el hombre dependía más de ellas. Todos estos factores obligaron a un cambio en la estrategia reproductiva del ñame, que se convirtió en un cultivo de propagación vegetativa con una limitada reproducción sexual (Dumet y Ogunsola, 2008).

1.5.1 Propagación por semilla sexual

Una de las características de las plantas de ñame es que generalmente son dioicas, es decir, plantas que tienen únicamente flores masculinas y plantas que tienen solo flores femeninas. Por lo general, las flores masculinas y femeninas no aparecen al mismo tiempo. Debido a esta asincronía en la floración, la oportunidad de encontrar semillas fértiles es reducida, y en el caso de lograrse, estas semillas presentarían bajos porcentajes de germinación. En general, se considera que las dificultades para obtener reproducción sexual en el ñame se deben fundamentalmente a fenómenos de poliploidía que han llevado a la especie a una virtual esterilidad sexual (Álvarez, 2000).

1.5.2 Propagación vegetativa

La propagación vegetativa es el sistema comúnmente utilizado en campo para cultivar las plantas de ñame. En este tipo de propagación, la planta se desarrolla a partir de tubérculos enteros, secciones de tubérculos o bulbillos aéreos (Sánchez y col., 2008).

El ciclo vegetativo del ñame dura aproximadamente ocho meses (**Figura 2**). Los tubérculos se siembran generalmente con las primeras lluvias a finales de marzo o a principios de abril y el cultivo maduro generalmente está listo para su cosecha en los meses

de noviembre a diciembre. Durante dos a tres meses después de la cosecha, los tubérculos pasan a través de un periodo de latencia durante el cual no germinan. Para acortar esta fase, el tubérculo se puede dividir en tres regiones: cabeza, central y distal. Las tres secciones tienen la capacidad de desarrollar yemas y germinar (Rodríguez, 2000).

Luego de la siembra, la yema germinativa se desarrolla dando origen al tallo o bejuco. A los tres meses, con la formación total del follaje, se obtiene la mayor tasa de producción de la fotosíntesis y los tubérculos comienzan a crecer pero su importancia como órgano de almacenamiento aún es insignificante. Al término de los 60 días siguientes, el crecimiento de las hojas y los tallos comienza a declinar en tanto el crecimiento de los tubérculos se incrementa exponencialmente. A las pocas semanas, el follaje decae y los tubérculos maduros están listos para la cosecha (González, 2012).

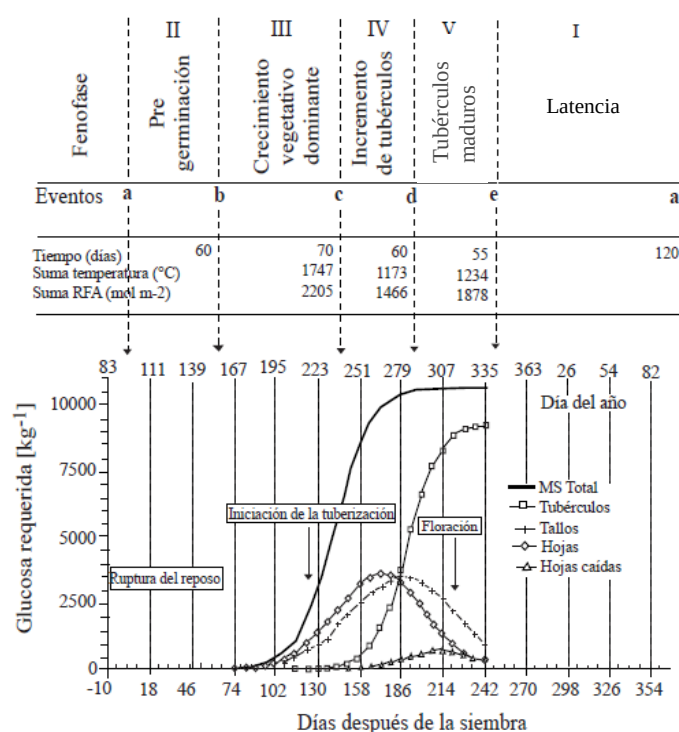


Figura 2. Fases fenológicas del ñame: (a) rompimiento del reposo de los tubérculos; (b) más del 90% de las plantas germinadas; (c) máxima tasa de crecimiento de la biomasa total; (d) máxima tasa de crecimiento de los tubérculos; (e) más del 75% de los tubérculos maduros. Tomada de Rodríguez (2000).

1.6 Enfermedades que atacan al cultivo de ñame en América Latina

La baja fertilidad del suelo, la competencia con malezas y el ataque de las plagas y enfermedades en el campo y durante el almacenamiento, limitan la producción y la productividad del cultivo de ñame. Aunque se han reportado pérdidas del 100% de la producción atribuidas precisamente a estos problemas, la información sobre la significancia económica de las plagas y enfermedades es a menudo insuficiente o inadecuada (Lebot, 2009).

La disponibilidad del material de plantación sano es la mayor limitación para los agricultores quienes siembran tubérculos a partir de plantas ya infectadas o algunas veces asintomáticas y las usan indiscriminadamente para la plantación. Esta práctica no solo contribuye a la expansión de plagas y enfermedades sino que también afecta la calidad del producto final (Bhattacharjee y col., 2011).

La producción de ñame se ve afectada por una enfermedad llamada antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, que ataca el tallo y las hojas de las variedades susceptibles produciendo lesiones de forma irregular y de color marrón, reduciendo drásticamente los rendimientos al disminuir el área fotosintética. El uso de clones resistentes al patógeno se presenta como la opción más económica para controlar la enfermedad (Reina, 2012).

Vegas (1984) estudió en Venezuela la antracnosis del ñame reportando que en las especies *D. alata*, *D. cayenensis* y *D. floribunda*, la enfermedad es generalizada y aparece en el campo desde que las plantas empiezan a brotar y persiste en el cultivo hasta el final de su ciclo vegetativo, ocasionando quemazón, pérdida del follaje y consecuentemente un bajo rendimiento de tubérculos.

Otra enfermedad que afecta los cultivos de ñame es la marchitez producida por el hongo *Fusarium oxysporum*. Esta enfermedad se caracteriza por el marchitamiento repentino de las plantas, comenzando con una coloración amarillenta, necrosis de las raíces y parte del cuello donde el tallo se une al tubérculo y finalmente su muerte. También se ha reportado que los hongos pertenecientes a los géneros *Cercospora* y *Phyllosticta* producen pústulas en las hojas (Álvarez, 2000). Montaldo (1991) recomienda como medidas de control la

rotación de cultivos, la quema de residuos de tallos y tubérculos después de la cosecha, el uso de semillas sanas y la siembra de variedades resistentes.

Los virus de plantas son responsables de importantes pérdidas en los rendimientos, llegando en algunos casos a ser limitantes para el cultivo. Durante los últimos cinco años se ha observado el incremento en el número de plantas afectadas por sintomatología como mosaico, moteado, bandeamiento y deformación de la lámina foliar que indican la presencia de virus en el cultivo del ñame. Dentro de los virus que atacan al género *Dioscorea* se encuentran el Virus del Mosaico del Ñame (YMV), Virus del Mosaico del Pepino (CMV), Virus X de la Papa (PVX), así como el género *Badnavirus* y la familia *Rhabdovirus* (Álvarez, 2000).

La mayoría de los virus no se transmiten por semilla sexual, por lo tanto, las especies que se multiplican por esta vía tienen la posibilidad de liberarse de ellos en forma natural. Por otra parte, cuando las especies agámicas son infectadas sistémicamente por virus, ellos son transmitidos con alta eficiencia, desde la planta madre a la descendencia. Esta situación, comúnmente presente en especies que se multiplican por bulbos, tubérculos, esquejes o estacas, permite que la infección continúe de generación en generación y se disemine a diferentes regiones a través del comercio de estos propágulos (Brenes, 2010).

Igualmente, se tienen reportes que indican que algunos áfidos y nemátodos obran como vectores de los virus. Hasta ahora la única medida de control recomendada es la utilización de semillas sanas, provenientes de plantas sin síntomas. Montaldo (1991) comenta que en tubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) provenientes del Campo Experimental Padrón y almacenados en la Estación Experimental Miranda (FONAIAP) ubicada en Caucagua, Estado Miranda, se detectó la presencia, por primera vez en Venezuela, del nematodo *Scutellonema bradys* (Steiner & Le Hew, 1933) considerado como el causante de la pudrición seca del ñame. En los tubérculos afectados se observaron lesiones necróticas causadas por el nemátodo en las capas superficiales del órgano.

Rodríguez y col. (2008) identificaron el agente causal de una bacteriosis en ñame; para ello colectaron hojas de plantas enfermas ubicadas en el Guarataro, estado Bolívar, Venezuela. Las hojas mostraban lesiones acuosas y necróticas. Los resultados de las

pruebas bioquímicas y fisiológicas indicaron que los aislados corresponden a *Pantoea agglomerans*.

1.7 Composición química de los tubérculos de ñame

Entre las raíces y tubérculos usados en la alimentación humana, el ñame tiene gran importancia por constituir un producto de alto valor nutricional para poblaciones rurales y urbanas, el mismo proporciona alrededor de 200 calorías en la dieta diaria de más de 300 millones de personas del trópico. El tubérculo de ñame crudo presenta un elevado contenido de humedad (72-79%) y está constituido principalmente por carbohidratos, destacándose el almidón como principal componente de la fécula, sustancia alimenticia blanca, ligera y suave que se extrae del tubérculo y que corresponde entre 75 a 84% de su peso seco (Bonilla y Hernández, 2012).

Lebot y col. (2006) reportaron las características fisicoquímicas de tubérculos de 48 accesiones de *D. alata*: almidón 73,1% (63,6-78,6%), lípidos 0,3% (0,2-0,5%), proteínas 11,95% (8,8-17%), fibra dietética 6,3% (4-9%) y cenizas 2,2% (2-3,5%).

Según González (2012) el ñame es el único representante del grupo de raíces y tubérculos tropicales que muestra valores tan elevados de proteína cruda, con un buen balance de aminoácidos esenciales para la nutrición humana, tales como arginina, leucina, isoleucina, valina, encontrándose en menor proporción la histidina, triptófano y metionina.

Es de señalar que el ñame constituye una excelente fuente de minerales como el potasio (786,30 mg), magnesio (656,31 mg), calcio (448,36 mg), fósforo (140,14 mg), sodio (44,56 mg), hierro (34,30 mg), cobre (11,20 mg), manganeso (6,36 mg) y zinc (2,26 mg) (Shajeela y col., 2011). Además contiene niveles significativos de vitaminas A y C, así como la vitamina B1 o tiamina, importante en el crecimiento de los niños y la vitamina B5 de importancia para el sistema inmunológico. También contiene riboflavina, niacina, ácido ascórbico, piridoxina y carotenos (Lebot y col., 2006).

En cuanto al contenido de lípidos, generalmente es menor al 2% del peso seco por lo que la contribución de estos tubérculos a la ingesta diaria de grasa es despreciable. Al evaluar la composición de los lípidos presentes en diferentes especies de *Dioscorea*, Osagie (1982)

determinó que los ácidos grasos predominantes fueron el palmítico (16:0) y el linoléico (18:2n6), siendo este último uno de los ácidos grasos insaturados de mayor valor nutricional (Blanco y col., 2004).

Otros de los componentes químicos de gran importancia presente en los tubérculos de *Dioscorea* spp. son los ácidos orgánicos y los compuestos fenólicos, los cuales contribuyen a las propiedades o atributos sensoriales. En los tubérculos de ñame, los ácidos orgánicos de mayor importancia son: succínico, cítrico, málico y oxálico (Pacheco y Techeira, 2009).

Los compuestos fenólicos presentes en los tubérculos de ñame son los sustratos responsables de reacciones de oscurecimiento por acción de la enzima polifenoloxidasa, que pueden ocurrir en el tubérculo debido a cortes o daños en el mismo. Esto quiere decir que la concentración de compuestos fenólicos presentes en ciertos productos alimenticios es proporcional a su tasa de oscurecimiento (Akisoe y col., 2004).

Estos compuestos fenólicos no están presentes en cantidades significativas en los tubérculos de ñame recién cosechados, pero se incrementan significativamente durante el almacenamiento. En algunas ocasiones, al momento del corte o troceado se observa cierto oscurecimiento en la superficie de los tubérculos de ñame de diferentes variedades, siendo algunas más sensibles que otras. El cambio de color en la superficie de corte puede ser eliminado o reducido por la exclusión de oxígeno de la superficie o por tratamiento de la misma con antioxidantes como el ácido ascórbico o el ácido cítrico (Kaur y Kapoor, 2002).

El ñame presenta una composición similar a la de la papa y la yuca, pero con mayor contenido de proteínas y fibras respectivamente, lo que le confiere altas potencialidades con respecto a éstas y otras plantas de tubérculos tropicales, razón por la cual es muy apreciado en muchos países (González, 2012). Una ventaja añadida del ñame es que al ser un tubérculo no contiene gluten, por lo que puede ser una alternativa que permita más variedad a la dieta de una persona en caso de presentar la enfermedad celíaca (Royero y col., 2007).

1.8 Importancia económica del cultivo de ñame

La crisis de alimentos que hoy azota al mundo es uno de los peores obstáculos para el desarrollo de la humanidad, esta crisis solo puede ser revertida con un incremento en la producción de alimentos. Para ello resulta muy significativo valorar las diferentes especies de plantas, lo que incluye aquellas cuyos beneficios e importancia son aún desconocidos o poco divulgados, ya que han sido ignoradas a lo largo de la historia. En este sentido, actualmente los estudios relacionados con el valor nutricional de plantas cultivadas, poco utilizadas, y de plantas silvestres que resulten útiles para la alimentación son de considerable importancia, ya que pueden ayudar a identificar recursos con potencialidades nutritivas poco conocidas (González, 2012).

El almacenamiento de almidones en raíces y tubérculos resulta importante para la alimentación de los habitantes de países tropicales y subtropicales. Según Jayakody y col. (2007) la producción mundial de tubérculos está liderada por cinco especies: papa (*Solanum tuberosum* L., 46%), yuca (*Manihot esculenta* Crantz, 28%), Batata (*Ipomoea batatas* L., 18%), ñame (*Dioscorea* spp., 6%) y taro (*Colocasia esculenta*). Se proyecta que para el 2020, más de dos mil millones de personas de Asia, África y América Latina dependerán de estos cultivos como fuente principal de alimento, forraje o ingresos (Scott y col., 2000).

El ñame era considerado un cultivo de subsistencia, cultivado y consumido por personas pobres. Sin embargo, según reportes de la FAO, la producción mundial de este cultivo incrementó en un 40% entre los años 1961 y 1999 y en la actualidad su producción continúa aumentando, lo que probablemente no sólo se deba a su uso como alimento básico sino al desarrollo de la agroindustria farmacéutica que tornó el cultivo del ñame en un “agronegocio” (González, 2012).

Según las estadísticas publicadas por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el año 2014, el ñame se cultiva en 50 países tropicales con una producción mundial de 68.114.520 toneladas y en un área cosechada de 4.6 millones de hectáreas. Algunos autores destacan que los países tropicales africanos de la región occidental, en especial Nigeria, Costa de Marfil y Ghana son los mayores

productores de ñame a nivel mundial (**Tabla 1**). Nigeria asume el 70% de lo que se produce mundialmente, alcanzando valores superiores a los 45 millones de toneladas por año (FAOstat, 2014).

Tabla 1. Principales países productores de ñame (*Dioscorea* spp.)

País	Producción (t.año ⁻¹)
Nigeria	45.004.340
Ghana	7.119.000
Costa de Marfil	5.836.150
Colombia	424.995
Brasil	247.000

Fuente: FAOstat (2014)

En América Latina, el cultivo de ñame tiene gran importancia socioeconómica en los escenarios de la agricultura familiar con un significativo potencial de desarrollo, lo que contribuye a la alimentación humana en poblaciones rurales y urbanas además de ser fuente de empleo para medianos y pequeños productores. Colombia es el principal país productor de ñame en América Latina con 424.995 t.año⁻¹ (González, 2012).

Baco y col. (2007) señalan que el destino de la producción depende de la calidad del producto y de la época del año. Actualmente se ha valorado su potencial de expansión a través de la exportación de los tubérculos especialmente para Europa. De la producción brasilera de ñame 4000 t.año⁻¹ son exportadas, mientras que otros países suramericanos destinan el total de su producción al mercado interno. De aquí que este cultivo se destaque por su alto valor comercial, con fuerte potencial para el agronegocio de exportación hacia Europa y los Estados Unidos.

El ñame se cultiva en altitudes desde los 0 hasta los 300 msnm, con temperaturas entre 20 a 25 °C, precipitaciones superiores a los 2000 mm anuales y en suelos de textura franca a franco arenosa, con buen drenaje. Según Vélez y Valery (1990) el cultivo se encuentra disperso en los estados Bolívar, Miranda, Barinas, Carabobo, Anzoátegui, Guárico, Monagas, Yaracuy y Cojedes y se siembra principalmente la especie *Dioscorea alata*,

seguida por *D. cayenensis*, *D. trifida*, *D. bulbifera*, y *D. esculenta*. La “Hoja de Balance de Alimentos” más actualizada publicada por el Instituto Nacional de Nutrición reporta que la producción nacional de ñame para el año 2013 resultó ser de 144.680 toneladas.

1.9 Usos del ñame

Aun cuando existe un gran número de estudios y publicaciones acerca del uso de este tubérculo, aún no ha logrado captar un interés comercial e industrial significativo. Vale la pena acotar, que por el alto contenido de almidón de sus tubérculos, el ñame sirve como espesante de sopas o cremas y también se comercializa en forma de harina y de almidón con los mismos fines culinarios que pueden aplicarse al almidón o a la harina de cereales (espesante y energizante de los platos) (Royer y col., 2007).

El ñame es ampliamente consumido en el continente asiático como sustituto del arroz y al deshidratarse bajo la forma de harina puede ser utilizado en la elaboración de sopas, panes y galletas (Rincón y col., 2000; Hsu y col., 2004). En Hawai e Indonesia, el ñame es frecuentemente consumido bajo la forma de una pasta fermentada denominada “poi”, o como “chips” productos similares a las papas fritas; aunque también suele ser consumido bajo la forma de “kulolo” producto de aspecto semisólido que contiene cierta cantidad de coco y azúcar. En África, el ñame se usa en la preparación de “fufu” alimento tradicional en estos pueblos. En América Latina, el ñame generalmente se consume cocido como parte de los tradicionales sancochos (Teixiera y col., 2006).

Algunas especies de ñame poseen metabolitos secundarios con efectos medicinales como antitrombóticos, mejorador de enfermedades coronarias y angina pectoral en el caso de *D. zingiberensis*, anticancerígenos en el caso de *D. collettii* var. *Hypoglauca* y *D. bulbifera*, y algunos asociados a la gastritis. Sumado a estos compuestos se puede aislar diocinas utilizadas como expectorantes, antiinflamatorios, antifúngicos y antibióticos. Se incluyen también inmunoestimulantes y antioxidantes como la dioscorina encontrados en *D. alata* y mucopolisacáridos de *D. batata* con propiedades terapéuticas para el bienestar humano (Bonilla y Hernández, 2012).

A nivel industrial, el ñame se emplea para la extracción de alcaloides y saponinas, particularmente las diosgeninas utilizadas en la elaboración de fármacos esteroidales como

cortisona, hormonas sexuales y anticonceptivos orales. Últimamente, la extracción de compuestos para la obtención de bioplástico ha resultado ser una alternativa idónea de manejo ambiental (Pacheco y Techeira, 2009).

Una vez reseñados los aspectos más importantes de este cultivo, en los siguientes capítulos se profundizará en temas relacionados con la caracterización morfológica y molecular de seis clones de ñame, la importancia nutricional del almidón de sus tubérculos y la propagación *in vitro* para su posterior establecimiento en el banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.

CAPÍTULO 2. Caracterización morfológica y molecular de las plantas de ñame (*Dioscorea alata* L.)

Los bancos de germoplasma poseen colecciones muy diversas de recursos fitogenéticos y su objetivo general es la conservación a largo plazo del germoplasma vegetal y su accesibilidad para los fitomejoradores, investigadores y otros usuarios. Los recursos fitogenéticos constituyen el material de partida para el mejoramiento de cultivos y su conservación y uso es esencial para la seguridad alimentaria a nivel mundial (FAO, 2014).

Sin embargo, se ha señalado que una de las causas de la baja utilización de los recursos fitogenéticos es la falta de información sobre éstos. Por ello en la formulación del Plan Global de Acción de Recursos Fitogenéticos para Alimentación y Agricultura (FAO, 1996) se incluyó el incremento de las acciones de caracterización y evaluación del material vegetal. En el Plan se señala que la ausencia de este tipo de acciones impide el aprovechamiento del valor de la variabilidad genética, de lo cual se derivan unos costos de conservación elevados con relación a los beneficios obtenidos a partir de las colecciones (Polanco, 2011).

La caracterización morfológica de recursos fitogenéticos es la determinación de un conjunto de caracteres mediante el uso de descriptores definidos que permiten diferenciar taxonómicamente a las plantas. La caracterización morfológica en combinación con la caracterización molecular provee una mejor descripción e interpretación de la diversidad genética de los individuos. Los descriptores morfológicos y los marcadores moleculares se utilizan para estudiar la variabilidad y para conservar los recursos genéticos. Por lo tanto, la caracterización de los materiales considerados como potencial filogenético desempeña un papel importante ya que permite la selección, conservación y posterior utilización de estos materiales en programas de mejoramiento (Aguirre, 2014).

En este sentido, debido a la necesidad de rescatar el cultivo de ñame considerado de subsistencia en nuestro país e incluirlo en programas de mejoramiento, se realizó la caracterización morfológica y molecular de seis clones de ñame (clon D2, clon D7, clon D8, clon D13, clon colombiano y clon venezolano) del banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.

1. ANTECEDENTES

1.1 Caracterización del germoplasma de ñame

El ñame es un cultivo que posee una alta variabilidad genética debido a la continua domesticación de especies silvestres en muchos países del mundo; sin embargo, algunos autores consideran que la domesticación intensiva del ñame ha contribuido progresivamente con la degradación de los bosques y tierras fértiles, así como también con la pérdida de variedades locales (Rodríguez, 2000; González, 2012). Por lo tanto, es de suma importancia invertir en la conservación del germoplasma de ñame para el resguardo de la diversidad genética de especies cultivadas y silvestres en las áreas tropicales y subtropicales (Bhattacharjee y col., 2011).

Existen dos estrategias generales para la conservación del germoplasma de ñame: *in situ* y *ex situ*. La conservación *in situ* consiste en el mantenimiento de las plantas en el área donde desarrollaron sus propiedades características. Esta es la mejor opción si se desea mantener un germoplasma que evolucione con su ambiente natural. Por otra parte, la conservación *ex situ* complementa a la conservación *in situ* y se define como la conservación de los recursos biológicos fuera de su hábitat natural, los cuales pueden estar ubicados en bancos de semillas, jardines botánicos, viveros, arboretum y herbarios (Aguirre, 2014).

El Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) ubicado en Ibadán, Nigeria, mantiene la más grande colección de ñame a nivel mundial con 3087 accesiones de África occidental. Ocho especies están representadas en esta colección: *D. rotundata*, *D. alata*, *D. dumetorum*, *D. cayenesis*, *D. bulbifera*, *D. mangelotiana*, *D. esculenta* y *D. preusii*. Dos de ellas (*D. rotundata* y *D. alata*) representan el 67 y el 25% de la colección total, respectivamente. Estas accesiones se mantienen por un convenio con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y se distribuyen sin restricción alguna para su uso en investigaciones referidas a la seguridad alimentaria (Bhattacharjee y col., 2011).

También se han reportado otras colecciones de germoplasma de ñame en África (Burkina Faso, Camerún, Suráfrica y Uganda); las islas del Caribe (Barbados, Cuba,

Guadalupe, Jamaica, Santo Domingo y Trinidad y Tobago); América (Brasil, Colombia, Costa Rica, Guatemala, México, Panamá y Estados Unidos); las islas de pacífico (Fiji, Nueva Caledonia, Nueva Guinea, Islas Solomon, Tonga y Vanuatu) y Asia (Bangladesh, India, Indonesia, Japón, Nepal, Malasia, Filipinas, Sri Lanka, Tailandia y Vietnam). Además, el Global Crop Diversity Trust está actualmente apoyando la regeneración de varias colecciones en Benin, Togo, Ghana y Costa de Marfil (Maurie y col., 1998; Lebot, 2009).

La conservación del germoplasma de ñame por cualquiera de las estrategias antes mencionadas es de suma importancia, sin embargo no basta únicamente con el mantenimiento de una colección, también es necesario la caracterización morfológica y molecular que permita identificar de forma inequívoca todos los materiales conservados y así evitar duplicaciones. Además esta caracterización permitirá el uso de estos recursos fitogenéticos en programas de mejoramiento de los cultivos (Bhattacharjee y col., 2011).

1.2 Caracterización morfológica

La caracterización morfológica es la descripción de la variación que existe en una colección de germoplasma, registrando aquellas características que son altamente heredables, fácilmente observables y que se expresan en todos los ambientes. Esta actividad consta de tres componentes: una población representativa, una lista de descriptores y un instrumento de medición/registro (Olivera y col., 2014). El objetivo principal es determinar el grado de variabilidad existente en una población específica utilizando descriptores definidos. Dicha información alcanza su mayor utilidad en programas de mejoramiento que parten de la clasificación de individuos con características relevantes (Sánchez y col., 2008).

Además de proporcionar un mejor conocimiento del germoplasma disponible, la caracterización bien realizada presenta algunas ventajas adicionales: el establecimiento de la representatividad de la colección, la identificación de duplicados haciendo un uso más eficiente de los recursos humanos y financieros y la identificación de genes especiales o alelos particulares (López y col., 2008). También permite el establecimiento de colecciones núcleos que por definición comprenden un mínimo de redundancia de la diversidad

genética reunida en una especie cultivada y en las especies silvestres relacionadas (Valls, 1989).

Algunas veces realizar una caracterización morfológica tiene varias limitaciones entre las que destacan la escasez y baja calidad de las semillas, la pobre documentación de las colecciones y la baja disponibilidad de recursos económicos para el mantenimiento de los bancos de germoplasma (Hernández, 2013).

1.2.1 Descriptores morfológicos

El crecimiento de una planta se puede determinar como el cambio irreversible en volumen y en peso, siendo considerado un fenómeno cuantitativo que puede ser medido a lo largo del tiempo y determinado por parámetros como por ejemplo: ancho de la hoja, longitud de los tallos, acumulación de materia seca (biomasa), número de nudos y entrenudos, índice de área foliar. A diferencia del crecimiento, el desarrollo de una planta consiste en una serie de fenómenos cualitativos sucesivos referidos al proceso de cambios estructurales y fisiológicos de la planta (de Lima, 2009).

Durante el desarrollo de la mayoría de las plantas ocurren cambios fisiológicos y morfológicos que marcan su transición desde la etapa vegetativa a la reproductiva, cuando estos cambios se mantienen en el tiempo se convierten en caracteres y una vez que se puedan diferenciar grupos de plantas a partir de estos caracteres, entonces se les catalogan como descriptores morfológicos (Polanco, 2011).

Un descriptor es una característica o atributo que hace referencia a la forma, estructura o comportamiento de un individuo dentro de un banco de germoplasma. Deben ser altamente heredables, con alto valor taxonómico y agronómico y su expresión debe ser detectada a simple vista y registrada fácilmente para permitir diferenciar una accesión de otra. Los descriptores morfológicos han sido muy usados para la identificación de especies, familias y géneros de plantas (Hernández, 2013).

La caracterización morfológica involucra el uso de descriptores que son usualmente dominantes o recesivos, siendo los más útiles aquellos menos influenciados por el ambiente. Para que una característica morfológica pueda ser considerada como descriptor

no debe verse afectada por las diferentes condiciones ambientales, o si es afectada, esta variante debe ser mínima (Gómez, 2000).

En la mayoría de las plantas cultivadas, los órganos más importantes para la descripción morfológica son la flor y el fruto por estar menos influenciados por el ambiente, le siguen en importancia otros como las hojas, troncos, ramas, raíces y los tejidos celulares que muchas veces son muy difíciles de caracterizar (Enríquez, 1991).

Los descriptores para evaluar y caracterizar la diversidad genética son numerosos. Tradicionalmente se han utilizado las variaciones morfológicas relacionadas especialmente con el hábito de crecimiento, tamaño, forma y color de los órganos vegetales. Esta variación es mayor en las formas cultivadas que en las formas silvestres (López, 1999).

Los descriptores se pueden agrupar en dos tipos: **botánico-taxonómico** referidos a características altamente heredables y de poca variabilidad, como la forma de los tubérculos, tallo, hojas, flores y semilla o **morfoagronómico** que comprende los caracteres morfológicos que son relevantes en la utilización de las especies cultivadas. Pueden ser de tipo cualitativo como el color del follaje y de las flores o cuantitativo como el peso y tamaño del tubérculo, número de flores por planta y el número de semillas (Polanco, 2011).

1.2.2 Listas de descriptores

La uniformidad de los descriptores morfológicos utilizados es un requisito para que la caracterización tenga un valor universal, para ello se hace uso de una listas de descriptores bien definidos y rigurosamente probados que simplifican considerablemente todas las operaciones de registro, actualización, recuperación, intercambio y análisis de datos (González, 2003).

Los descriptores se presentan en un formato internacional y por ello proporcionan un lenguaje comprensible universalmente para los datos sobre los recursos fitogenéticos. Las listas de descriptores permiten disponer de un medio rápido, fidedigno y eficaz para almacenar, recuperar y comunicar la información presente en una colección (González, 2003). Además, el uso de estas listas les permitirá a los responsables de las colecciones

identificar las diferencias existentes entre los individuos y agrupar las accesiones de forma correcta (Torres, 2010).

El Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), ubicado en Roma, Italia, ha publicado listas de descriptores para 78 géneros de plantas. En estas listas se promueve la recolección de datos sobre las categorías: Pasaporte, Manejo, Sitio y ambiente, Caracterización y Evaluación (IPGRI/IITA, 1997).

Descriptores de pasaporte: proporcionan la información básica que se utiliza para el manejo general de la accesión (incluido el registro en el banco de germoplasma y cualquier otra información de identificación) y describen los parámetros que se deberían observar cuando se hace la recolección original de la accesión.

Descriptores de manejo: proporcionan las bases para el manejo de las accesiones en el banco de germoplasma y ayudan durante su multiplicación/regeneración.

Descriptores del sitio y el ambiente: describen los parámetros específicos del ambiente que son importantes cuando se realizan pruebas de caracterización y evaluación. Se incluyen también en esta categoría los descriptores del sitio de recolección del germoplasma.

Descriptores de caracterización: permiten una discriminación fácil y rápida entre fenotipos. Generalmente son caracteres altamente heredables, pueden ser fácilmente detectados a simple vista y se expresan igualmente en todos los ambientes. Además, pueden incluir un número limitado de caracteres adicionales considerados deseables por consenso de los usuarios de un cultivo en particular.

Descriptores de evaluación: muchos de los descriptores de esta categoría son susceptibles a las diferencias ambientales pero son generalmente útiles en el mejoramiento de un cultivo. Pueden involucrar la caracterización bioquímica y molecular, rendimiento, productividad agronómica, susceptibilidad al estrés y caracteres citológicos.

En la actualidad, el libro utilizado universalmente para caracterizar morfológicamente los cultivares de ñame se titula “**Descriptores para el ñame (*Dioscorea* spp.)**”. Fue

elaborado conjuntamente por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) y el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA).

Dentro de los descriptores morfológicos que definen las características del género *Dioscorea* spp. están el color y diámetro del tallo tanto joven como maduro, la presencia o no de espinas en la base del tallo o en todo el tallo, forma de las hojas jóvenes y maduras, tipo y posición de la inflorescencia, tamaño del fruto, presencia/ausencia de tubérculos aéreos, forma del tubérculo subterráneo así como su anchura, color de la piel, color de la pulpa, presencia/ausencia de grietas en su superficie y propiedades organolépticas del tubérculo luego de ser cocinado (IPGRI/IITA, 1997).

1.3 Caracterización molecular

A través del mejoramiento genético clásico varios clones pertenecientes a las especies *D. alata* y *D. rotundata* fueron desarrollados por el IITA en asociación con programas nacionales en África y se difundieron para su evaluación y selección bajo condiciones ambientales locales. Siete variedades de *D. rotundata* fueron liberadas en Nigeria entre los años 2001 y 2003 y se están preparando más líneas para ser liberadas en los países productores de ñame como Benin, Burkina-Faso, Costa de Marfil, Ghana, Sierra Leona y Togo. Estas variedades tienen múltiples resistencias a plagas y enfermedades, poseen una amplia adaptabilidad y buenos atributos organolépticos (Mignouna y col., 2003).

Sin embargo, el progreso del mejoramiento clásico para aumentar el rendimiento, la adaptabilidad a ambientes marginales, la mejora de la calidad de los tubérculos y la resistencia a plagas y enfermedades, ha sido lento debido a limitaciones biológicas que impiden el esclarecimiento de la genética de rasgos importantes en el ñame. Estos incluyen un ciclo de crecimiento largo, dioecia, floración pobre o nula, poliploidía, propagación vegetativa, antecedentes genéticos heterocigotos y escaso conocimiento de la diversidad del cultivo (Asiedu y col., 1998).

El mejoramiento y la selección de los cultivares de ñame con características nuevas o mejoradas sufre actualmente el hecho de que los cultivares tradicionales no han sido adecuadamente caracterizados. Existe una variación lingüística considerable en la nomenclatura de los cultivares de ñame, cada localidad tiene sus propios nombres. Esto

dificulta seriamente la identificación fiable de los cultivares para el manejo y mejoramiento del germoplasma (Bhattacharjee y col., 2011). Se han utilizado sistemas de clasificación e identificación basados en caracteres morfológicos (González 2003, Sánchez y col., 2008), perfiles de proteínas solubles en tubérculos (Ikediobi y Igboanusi, 1983) o patrones de isoenzimas, para caracterizar el germoplasma de ñame (Dansi y col., 2000; Mignouna y col., 2002).

Los criterios morfológicos son eficaces pero presentan inconvenientes prácticos debido a que la expresión de las características morfológicas a menudo se ve afectada por el ambiente, incluyendo el método de cultivo (Sánchez y col., 2008). Por otra parte, una desventaja importante de los perfiles proteicos es que pueden cambiar con el estado fisiológico del tubérculo y usualmente dependen de las condiciones de almacenamiento de estos órganos (Ikediobi y Igboanusi, 1983). Finalmente, si bien las isoenzimas han demostrado ser herramientas valiosas para la discriminación genética de los cultivares de ñame, los sistemas de isoenzimas polimórficas son a menudo inadecuados para la identificación inequívoca de cultivares individuales dentro de amplios grupos (Dansi y col., 2000).

El descubrimiento de los marcadores moleculares, el estudio del genoma y la transformación genética de plantas ha abierto vías para esquivar los obstáculos que se presentan para lograr el mejoramiento de los cultivos. Una mejor comprensión de la diversidad genética disponible es de suma importancia para elegir los parentales que pudiesen ser utilizados en programas de mejoramiento (Bhattacharjee y col., 2011).

Los primeros esfuerzos en la genómica del ñame se dedicaron al desarrollo de marcadores de ADN polimórficos y a la evaluación de su posible aplicación para caracterizar el germoplasma. Inicialmente se hicieron varios intentos para seleccionar secuencias heterólogas de ADN como fuente de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Posteriormente se diseñaron otros marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) entre los que podemos mencionar los polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD) y los

polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) (Mignouna y col., 1998).

Mignouna y col. (1998) evaluaron la diversidad genética de *D. rotundata* utilizando iniciadores RAPD y AFLP. En ambos casos los polimorfismos generados fueron muy altos; sin embargo, con AFLP se identificaron más de 1000 marcadores polimórficos mientras que con RAPD el nivel de polimorfismo fue menor. Debido a esto los marcadores moleculares RAPD no se consideran un buen sistema para propósitos de mapeo, mientras que el alto nivel de polimorfismo revelado por los marcadores AFLP junto con su robustez lo convirtió en un sistema más fiable y reproducible para el análisis del genoma de ñame. Posteriormente, con el avance de la genómica del ñame se diseñaron otro tipo de marcadores moleculares tales como secuencias simples repetidas (SSR) o microsatélites que permitieron evaluar los caracteres codominantes.

Mignouna y col. (2003) investigaron la eficiencia de los marcadores AFLP, RAPD y SSR para la detección de polimorfismos y relaciones genéticas entre 45 cultivares de ñame (*D. rotundata*) colectados en el centro y occidente de África. Los resultados mostraron que cada uno de los tres marcadores puede identificar inequívocamente cada cultivar; sin embargo, difieren en el número de polimorfismos generados por iniciador (o combinación de iniciadores) en cada cultivar, lo cual se denomina Índice Genotipo (GI). El orden de mérito basado en este criterio fue AFLP (GI = 1,0), SSR (GI = 0,39) y RAPD (GI = 0,35). Así AFLP mostró la mayor eficiencia en la detección de polimorfismo y reveló relaciones genéticas que reflejan de la manera más estrecha una clasificación morfológica.

El uso de marcadores moleculares para obtener información a nivel genético ofrece una solución práctica a muchos de los problemas del mejoramiento de ñame. Los mapas genéticos y el análisis asistido por marcadores moleculares pueden usarse para la caracterización del germoplasma y para esclarecer aspectos agronómicos como el control genético del potencial de rendimiento y la calidad del tubérculo, así como también para localizar genes de resistencia a plagas y enfermedades, eficiencia en el uso de nutrientes y floración (Bhattacharjee y col., 2011).

1.3.1 Polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP).

Los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados son un tipo de marcador molecular que está basado en la restricción del ADN genómico mediante enzimas de restricción y la subsecuente amplificación de algunos de esos fragmentos mediante PCR. Estos marcadores moleculares son una herramienta poderosa de análisis de genomas dado que poseen un alto poder de detección de la variabilidad genética. El ensayo AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción, con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR (Vos y col., 1995; Nybom y col., 2014).

El ensayo de AFLP consiste esencialmente en cuatro etapas (**Figura 3**). En la primera de ellas el ADN genómico se corta o se digiere con dos enzimas de restricción. Generalmente una de ellas es de corte poco frecuente, que reconoce de 6 a 8 pares de bases y otra es de corte frecuente que reconoce 4 pares bases. En la segunda etapa, los adaptadores (fragmentos de ADN de doble cadena con 30 a 20 pares de bases) se ligan en forma específica a los extremos de los fragmentos obtenidos en el paso anterior, generando así el molde para la amplificación posterior del ADN. En la tercera etapa, los fragmentos se amplifican selectivamente por PCR. En esta etapa se utilizan iniciadores de aproximadamente 20 nucleótidos que contienen una secuencia específica complementaria a la secuencia de los adaptadores y además de 1 a 3 nucleótidos selectivos adicionales de secuencia arbitraria en su extremo 3'. Dado que solo una subpoblación de los fragmentos originales es amplificada, se obtiene un patrón de bandas que permite un registro adecuado (Vos y col., 1995; Vuylsteke y col., 2007).

La amplificación descrita en la tercera etapa se realiza en dos pasos: una primera amplificación selectiva empleando un nucleótido arbitrario (preamplificación) y luego este producto de amplificación obtenido es empleado como molde en una nueva amplificación utilizando iniciadores que poseen dos nucleótidos selectivos adicionales al anterior (amplificación final). La cuarta y última etapa del ensayo AFLP involucra el análisis de los fragmentos amplificados, el cual se realiza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y teñidos con Nitrato de plata (Vos y col., 1995; Vuylsteke y col., 2007).

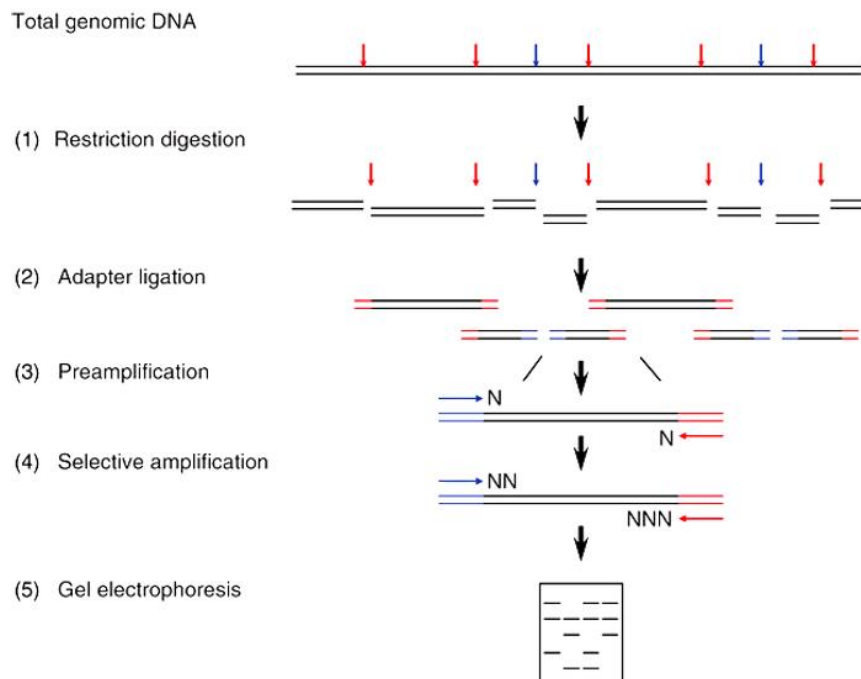


Figura 3. Etapas de la técnica de AFLP (Tomado de Vuylsteke y col., 2007).

La base genética del polimorfismo que se observa en los ensayos de AFLP, es decir, la ausencia o presencia de fragmentos amplificados de un tamaño específico, está determinada por mutaciones puntuales, inversiones, inserciones y deleciones que llevan a la pérdida o ganancia de un sitio de restricción o la alteración de la secuencia reconocida o amplificada por los iniciadores. Con esta técnica no es posible distinguir individuos heterocigotos por lo que se trata de un marcador dominante. Una banda AFLP se suele interpretar como un locus definido por las dos enzimas de restricción, una combinación de iniciadores que incluyen las bases selectivas y un tamaño molecular (Vos y col., 1995; Nybom y col., 2014).

1.3.2 Ventajas y desventajas de los AFLP

La técnica de AFLP requiere de una buena calidad de ADN para el proceso de digestión con enzimas de restricción lo cual proporciona un resultado más preciso en el proceso de amplificación. Entre las ventajas más destacadas de los AFLP podemos citar que no requieren del conocimiento previo del genoma, poseen un polimorfismo elevado y se puede

tener un resultado que refleja todo el genoma. Además, son muy reproducibles y versátiles por las distintas enzimas e iniciadores selectivos (Vos y col., 1995).

Mientras que las desventajas de esta técnica es que son de herencia dominante, tienen bajo contenido de información genética por locus, es una técnica laboriosa y muy costosa y la preparación de los geles de acrilamida requiere de gran destreza, además de que es una sustancia muy tóxica (Aguilar, 2012).

1.4 Trabajos previos relacionados con la caracterización morfológica y molecular de las plantas de ñame.

Bustamante y col. (2001) reportaron la caracterización molecular de ocho variedades de ñame (*D. alata*) utilizadas en el Programa Colombiano de Biotecnología Agrícola (PBA), a través de marcadores moleculares tipo AFLP para determinar si existe concordancia entre la taxonomía morfológica con la discriminación y agrupación de los individuos por sus perfiles de bandas moleculares aportados por los AFLP. Los resultados muestran que de las ocho variedades de *Dioscorea alata* analizadas solamente tres de ellas presentan polimorfismos que permiten diferenciarlas. Las otras cinco se agruparon como una sola variedad.

Egesi y col. (2006) evaluaron la variabilidad intraespecífica en *D. alata* mediante el uso de marcadores moleculares AFLP. Analizaron 53 accesiones de distintos orígenes geográficos (Benin, Costa de Marfil, Ghana y Nigeria) con tres combinaciones de iniciadores AFLP. De los 342 productos de amplificación generados, 53,4% fueron polimórficos y el coeficiente de similitud genética osciló entre 0,29 y 0,95, agrupando a las accesiones en tres grupos. En cada grupo se encontraron accesiones de diferente origen geográfico, lo cual indica que la geografía no desempeña un papel importante en la diferenciación de la especie.

Sánchez y col. (2008) realizaron una caracterización morfológica de 25 accesiones de ñame colectadas en el suroccidente de Guatemala reportando la separación en varios grupos debido principalmente a sus diferencias con relación al peso y longitud de los tubérculos. Estos autores comentaron que el manejo agronómico del cultivo por parte de los agricultores era rudimentario, sin fertilización ni control de plagas y enfermedades, por esta

razón establecieron un banco de germoplasma con los cultivares de ñame para el resguardo de este importante rubro.

Tariquil y col. (2011) reportaron la caracterización morfológica de 59 accesiones de *Dioscorea alata* utilizando descriptores tales como la dirección de trepado de la planta, la presencia de alas o espinas en el tallo, la forma y longitud de la hoja, la forma y tamaño de los tubérculos aéreos y el rendimiento de los tubérculos subterráneos. La máxima variabilidad se encontró en el rendimiento de los tubérculos por planta (98,74%) y la mínima se encontró en la longitud de la hoja (12,55%).

Rivera y col. (2011) determinaron la variabilidad genética intra e interespecífica de 20 accesiones de *Dioscorea* spp. de la región caribe colombiana mediante AFLP. Los valores promedio de similitud variaron entre 41,81% entre *D. alata* y *D. rotundata* y 33,51% entre *D. trifida* y *D. esculenta*, lo que sugiere una alta diversidad genética entre las accesiones estudiadas que formaron cuatro grupos genéticos: *D. alata*, *D. rotundata*, *D. trifida* y *D. esculenta*. En términos de la diversidad intraespecífica, para la especie *D. alata* el análisis también reveló una composición heterogénea en la región caribe colombiana.

Aguilar (2012) realizó la caracterización morfológica y molecular de 63 accesiones de ñame (*Dioscorea* spp.) del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). En la caracterización morfológica se trabajó con 60 descriptores definidos por el IPGRI/IITA (1997). Con estos descriptores se definieron seis grupos de accesiones siendo las características más discriminantes: longitud del tallo joven, número de entrenudos del tallo joven, número de tallos maduros por planta, número de entrenudos hasta la primera ramificación, número de ramificaciones en el tallo maduro, diámetro del tallo maduro, longitud de los entrenudos en el tallo maduro, número de hojas jóvenes y número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas. En la caracterización molecular se evaluaron 46 accesiones con seis combinaciones de iniciadores AFLP. El análisis molecular no permitió la separación de las accesiones de la colección por especies quizás por el bajo número de combinaciones estudiadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Establecimiento del banco de germoplasma de ñame

En el mes de diciembre del año 2013, la sede del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) ubicada en Cúpira, estado Miranda, realizó gentilmente una donación de tubérculos pertenecientes a 10 clones de ñame identificados como *D. alata* por comunicación personal con los proveedores de este material (clon D2, clon D5, clon D6, clon D7, clon D8, clon D9, clon D10, clon D12, clon D13, clon venezolano (CV)). El propósito de esta donación fue establecer un banco de germoplasma en el vivero del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal (LMV), que fuese un duplicado de la colección que ellos mantenían en sus Centros de Investigación.

En esta misma fecha, también recibimos una donación del Ingeniero Eder Durango, quien gentilmente nos proporcionó los tubérculos de clon colombiano (CC) y el almidón extraído de su pulpa, enviados desde la Universidad Pontificia Bolivariana sede Montería, en Colombia.

Todos los tubérculos, tanto los donados por el INIA como los enviados desde Colombia, se colocaron en bolsas de papel identificadas con el nombre del clon al cual pertenecen y se mantuvieron bajo condiciones de invernadero, con luz difusa y a 26 °C, con el propósito de promover la ruptura de la latencia y el brote de las primeras yemas.

Posteriormente, en el mes de marzo del año 2014, los tubérculos con sus brotes se sembraron de manera individual en macetas de 20 kg de capacidad, colocadas en el vivero del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal con un riego interdiario en horas tempranas de la mañana o a finales de la tarde.

Como se comentó en el Capítulo 1, las plantas de ñame son enredaderas que requieren de soportes en donde pueden enrollar sus tallos y seguir creciendo hasta alcanzar su madurez. La modalidad de trepado de la planta (hacia la derecha o hacia la izquierda) es un descriptor muy importante para su caracterización morfológica. En este sentido, en cada maceta se colocó un soporte con el propósito de favorecer el crecimiento de los tallos y evaluar su orientación. Cada 20 días aproximadamente se removió la maleza manualmente.

2.2 Caracterización morfológica de seis clones de ñame del banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal

En esta investigación se realizó la caracterización morfológica de seis clones de ñame (clon D2, clon D7, clon D8, clon D13, clon colombiano y clon venezolano) establecidos en el banco de germoplasma del LMV, utilizando para ello la lista de “Descriptoros para el Ñame (*Dioscorea* spp.)” publicada por el Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI/IITA, 1997).

Esta lista comprende 154 descriptoros referidos al crecimiento vegetativo y reproductivo de las plantas de ñame; sin embargo, debido a que el proceso de floración es poco frecuente no se tomaron en cuenta los descriptoros relacionados con flores y frutos. Se evaluaron 90 descriptoros distribuidos de la siguiente manera: 26 relacionados con las características de los tallos (jóvenes y maduros), 30 referidos a las hojas (jóvenes y maduras) y 30 relacionados con los tubérculos subterráneos. Según la clasificación propuesta por Gómez (2000), en esta investigación se estudiaron descriptoros multiestado de tipo cualitativos y cuantitativos y descriptoros de doble estado de tipo ausencia/presencia.

La caracterización morfológica inició a los 20 días después del brote registrando los descriptoros referentes al tallo y hojas jóvenes. Luego de cinco meses de cultivo se midieron los descriptoros para el tallo y hojas maduras y tres meses después se procedió a la cosecha de los tubérculos y se midieron los descriptoros referentes a estos órganos de almacenamiento.

2.2.1 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de la caracterización morfológica de los clones de ñame, se diseñó una matriz básica de datos en una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel® 2010 de Microsoft Corporation (Redmond, WA, EE. UU.). Dicha matriz consistió en un arreglo en forma de cuadrícula con tantas filas como clones (n) incluidos el estudio y una columna para cada variable (p) medida. Posteriormente, utilizando el programa estadístico Multi Variate Statistical Package (MVSP 3.1 Copyright 1989-2001 Kovach Corporation Service), se realizó un análisis de Cluster con el propósito de obtener las matrices de similitud a partir del coeficiente de Jaccard y se construyó un dendrograma con la estrategia de

agrupamiento centroidal. También se realizó un análisis de componentes principales con el propósito de determinar los descriptores morfológicos que aportan la mayor variabilidad entre los clones.

2.3 Caracterización molecular de seis clones de ñame cultivados *in vitro*.

Con el propósito de evaluar la variabilidad genética de los clones de ñame y su relación con las características morfológicas, se realizó la caracterización molecular utilizando para ello marcadores AFLP. Como material vegetal se utilizaron vitroplantas de los seis clones de ñame, de dos meses de edad, establecidas *in vitro* a partir del cultivo de microesquejes tomados de plantas de vivero, debidamente desinfectados y mantenidos bajo condiciones de estricta esterilidad en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal. Adicionalmente, añadimos como control vitroplantas de papa var. ‘Granola’ y ‘Arbolona negra’ debido a que sus genomas han sido ampliamente caracterizados en investigaciones previas realizadas en el laboratorio.

2.3.1 Extracción del ADN

La extracción del ADN de ñame y de papa se realizó por duplicado a partir de 150 mg de tejido foliar, siguiendo el protocolo propuesto por Oropeza y col. (2006) el cual se basa en el método de Doyle y Doyle (1990) con las siguientes modificaciones: a) un tratamiento con RNAsa “A” (10 mg/ml), b) un tratamiento con solución limpiadora: (etanol 76% en 10mM acetato de amonio (NH_4COOH) y c) precipitación con 7,5M NH_4COOH . Para determinar la cantidad y pureza del ADN extraído, se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm en un espectrofotómetro Thermo Electron modelo Spectronic Genesys 10Bio. Se calculó la concentración de ADN y se concentraron todas las muestras a 50 ng/μl. La integridad del ADN aislado fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa 0,8% en buffer TBE 0,5X (Sambrook y Russell, 2001). De acuerdo con los resultados obtenidos se seleccionaron las muestras de ADN que mostraron mayor pureza e integridad para realizar la caracterización molecular.

2.3.2 Digestión del ADN y ligación de adaptadores

Se tomaron 10 µl de ADN de cada clon de ñame y 10 µl de ADN de papa var. ‘Arbolona negra’ y se sometieron a digestión con la enzima de corte frecuente *Taq*^qI 20 u/µl. Esta reacción se incubó durante tres horas a 65 °C (Bachem y col., 1998).

Digestión con *Taq*^qI

	[Stock]	[Deseada]	Vol _{1X}
Búfer 4	10 X	1X	4 µl
BSA	100 X	1X	0,4 µl
<i>Taq</i> ^q I	20 u/µl	20 u	1µl
DNA	10 µl		10 µl
H ₂ O-miliq			24,6 µl

Luego de la primera digestión se realizó a una segunda digestión con la enzima de corte poco frecuente *Ase*I 10 u/µl. Esta reacción se incubó durante tres horas a 37 °C (Bachem y col., 1998).

Digestión con *Ase*I

	[Stock]	[Deseada]	Vol _{1X}
Búfer 3	10 X	1X	1 µl
<i>Ase</i> I	10 u/µl	10 u	1µl
H ₂ O-miliq			8 µl

Una vez digerido el ADN, se sometió a una reacción de ligación con los adaptadores necesarios para poder amplificar de forma diferencial los fragmentos obtenidos. Para ello se tomó el total de la mezcla de digestión y se mezcló con los adaptadores *Taq*^qI y *Ase*I.

Ligación con adaptadores

	[Stock]	[Deseada]	Vol _{1X}
Búfer ligasa con ATP	10 X	1X	6 µl
Adaptador <i>Taq</i> ^q I	50 pM	1 pM	1,2 µl
Adaptador <i>Ase</i> I	5 pM	0,1 pM	1,2 µl
T4 ADN ligasa	400 u/µl	20 u	0,5 µl
H ₂ O-miliq			1,1 µl

Esta reacción se incubó durante 16 horas a 18 °C, luego se detuvo incubándola por 10 min a 70 °C y se guardó a -20 °C.

2.3.3 Preamplificación y amplificación diferencial

El producto de la reacción de ligación con adaptadores es considerado el templado primario para la amplificación por PCR diferencial.

Preparación del templado primario

	[Stock]	[Deseada]	Vol _{IX}
Búfer	5X	1X	10 µl
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	5 µl
dNTPs	25 mM	0,25 µM	0,5 µl
Taq L	100 ng/µl	100 ng	1 µl
Ase R	100 ng/µl	100 ng	1 µl
Taq pol	5 u/ µl	2,5 u	0,5 µl
Templado		10 µl	10 µl
H ₂ O-miliq			22 µl

Las condiciones de ciclado fueron propuestas por Bachem y col. (1998)

Desnaturalización	94 °C por 1 min	} 20 ciclos
Hibridación	56 °C por 1 min	
Extensión	72 °C por 2 min	

La observación de los fragmentos de ADN amplificados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,8%.

Para la amplificación por PCR diferencial se emplearon 15 combinaciones de iniciadores, las cuales fueron organizadas en tres geles como se muestra en la **Tabla 2**, analizando para cada combinación el ADN de los seis clones de ñame (D2, D7, D8, D13, CC, CV) y el ADN de papa, var. ‘Arbolona negra’ (AN).

Tabla 2. Análisis de las combinaciones de iniciadores empleados en la amplificación diferencial

1 ^{er} gel	2 ^{do} gel	3 ^{er} gel
Ase 01-Taq 02	Ase 08-Taq 03	Ase 09-Taq 02
Ase 04-Taq 14	Ase 08-Taq 05	Ase 09-Taq 03
Ase 06- Taq 09	Ase 08- Taq 07	Ase 09-Taq 05
Ase 06- Taq 16	Ase 08- Taq 09	Ase 09-Taq 12
Ase 08-Taq 02	Ase 08- Taq 16	Ase 09-Taq 14

Preparación de la PCR diferencial

	[Stock]	[Deseada]	Vol _{IX}
Búfer	5X	1X	2 µl
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1 µl
dNTPs	2 mM	0,2 µM	1 µl
Iniciador Taq	100 ng/µl	50 ng	0,5 µl
Iniciador Ase	100 ng/µl	50 ng	0,5 µl
Taq pol	5 u/µl	1 u	0,2 µl
Templado	0,5 ng/µl		4,8µl

Las condiciones de amplificación se desarrollaron en dos fases, según Bachem y col. (1998).

Desnaturalización	94 °C por 30 s	} 11 ciclos
Hibridación	65 °C por 30 s	
Extensión	72 °C por 1 min	
Desnaturalización	94 °C por 30 s	} 30 ciclos
Hibridación	56 °C por 30 s	
Extensión	72 °C por 1 min	

En la **Tabla 3** se detalla la secuencia nucleotídica de los iniciadores utilizados en la amplificación diferencial ADN-AFLP.

Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los iniciadores

Iniciador	Secuencia	Iniciador	Secuencia
Ase01	5'- GACTGCGTACCTAATAA- 3'	Taq02	5'- GATGAGTCCTGACCGAAG - 3'
Ase04	5'- GACTGCGTACCTAATAT- 3'	Taq03	5'- GATGAGTCCTGACCGAAC - 3'
Ase06	5'- GACTGCGTACCTAATGG- 3'	Taq05	5'- GATGAGTCCTGACCGAGA- 3'
Ase08	5'- GACTGCGTACCTAATGT- 3'	Taq07	5'- GATGAGTCCTGACCGAGC- 3'
Ase09	5'- GACTGCGTACCTAATCA- 3'	Taq09	5'- GATGAGTCCTGACCGACA- 3'
		Taq12	5'- GATGAGTCCTGACCGACT- 3'
		Taq14	5'- GATGAGTCCTGACCGATG- 3'
		Taq16	5'- GATGAGTCCTGACCGATT- 3'

2.3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Previo a la corrida de las muestras en geles de poliacrilamida se lavó cuidadosamente la cámara de electroforesis, los vidrios (30 x 30 cm) y los separadores con agua y jabón y se limpiaron tres veces con 1 ml de Etanol (EtOH) al 96% utilizando papel Kimwipe. Posteriormente, el vidrio donde se iba a adherir el gel se trató con una solución de 1ml de EtOH 96%-Ácido acético 95% y 3 µl de Bind Silane, distribuyendo uniformemente con papel Kimwipe. El segundo vidrio se trató por separado con 300 µl de Repel Silane, distribuyendo uniformemente con papel Kimwipe. Luego se ensambló la cámara con los vidrios, se sirvió el gel de poliacrilamida al 6% con urea 5M y se dejó polimerizar con el peine. Una vez polimerizado el gel se realizó una precorrida para descartar inconvenientes en el ensamblaje y la polimerización del gel, para lo cual se agregaron 5 µl de solución de parada (formamida, EDTA 0,5 M, azul de bromofenol, Xylen cyanol) y se realizó la precorrida durante 20 minutos a 110 W, 3000 V, 400 mA (Posso y Ghneim, 2009).

Se detuvo la precorrida y se retiró la urea acumulada en los bolsillos inyectando cuidadosamente amortiguador de corrida para evitar la formación burbujas. Posteriormente, se desnaturalizaron las muestras incubándolas a 95 °C durante 2 minutos y colocándolas inmediatamente en hielo. Se colocaron 5 µl de ADN y 2 µl de los marcadores de peso molecular 1Kb y pGEM ambos de Promega y se realizó la corrida de las muestras con las mismas condiciones de voltaje durante 2 horas (Posso y Ghneim, 2009).

2.3.5 Tinción de geles con nitrato de plata (AgNO_3)

Una vez terminada la corrida, se sumergió el gel en solución fijadora (ácido acético 8%) durante 20 minutos. Se lavó tres veces con agua desionizada durante dos minutos. Se escurrió bien y se sumergió en solución de tinción (AgNO_3 0,1%) durante 30 min.

Posteriormente se lavó muy bien el gel con agua desionizada por 10 segundos y se sumergió inmediatamente en solución reveladora (Na_2CO_3 3%, formaldehído 37%, tiosulfato de sodio 10 mg/ml) durante tres a cinco minutos. Finalmente se sumergió el gel en solución de parada (ácido acético 8%) durante 30 min y se lavó con agua desionizada hasta eliminar los restos de ácido (Posso y Ghneim, 2009). Los geles se secaron a

temperatura ambiente por un día y las imágenes fueron digitalizadas mediante el sistema GelDoc 2000 (BIORAD).

2.3.6 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos, en una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel[®] 2010 de Microsoft Corporation (Redmond, WA, EE. UU.) se construyeron matrices de presencia (1) o ausencia (0) de bandas originadas por la amplificación de los fragmentos digeridos para cada combinación de iniciadores. Posteriormente, se realizó un análisis de Cluster con el propósito de obtener las matrices de similitud a partir de coeficiente de Jaccard y se construyó un dendrograma consenso con la estrategia de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average), utilizando el paquete estadístico Multi Variate Statistical Package (MVSP 3.1 Copyright 1989-2001 Kovach Corporation Service).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Establecimiento del banco de germoplasma de ñame

Previo al establecimiento de un banco de germoplasma con material introducido es necesario registrar algunos datos útiles para el correcto mantenimiento de las plantas en un nuevo ambiente, entre ellos podemos mencionar: el nombre de la accesión, el nombre común que manejaban los proveedores, la procedencia, ubicación geográfica, entre otros. A estos datos se les conoce como descriptores de pasaporte y son importantes como punto de partida cuando se desea hacer una caracterización del germoplasma. En la **Tabla 4** se hace referencia a algunos descriptores de pasaporte registrados para los clones de ñame.

Tabla 4. Algunos descriptores de pasaporte reportados para los clones de ñame que conforman el banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.

Nombre de la accesión	Nombre común	Tipo de material recibido	Procedencia	Ubicación geográfica	Proveedor
D2	Ñame morado	Tubérculos	Sector Acevedo, Edo. Miranda	10°24'05.0" N 66°18'00.6" W	INIA-Miranda
D5	Ñame Gigante	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
D6	Pata de Danta Blanco	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
D7	Ñame largo blanco	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
D8	Ñame plano blanco	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
D9	Ñame Redondo	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
D10	Ñame Papa	Tubérculos	Patanemo. Sector La Primavera. Puerto Cabello, Edo. Carabobo	10°24'54.3"N 67°54'36.3"W	INIA-Miranda
D12	Ñame Concha Negra	Tubérculos	Patanemo. Sector La Primavera Puerto Cabello, Edo. Carabobo	10°24'54.3"N 67°54'36.3"W	INIA-Miranda
D13	Ñame concha de coco	Tubérculos	Cúpira, Edo. Miranda	10°09'38.9"N 65°41'53.5"W	INIA-Miranda
Clon venezolano	Criollo venezolano	Tubérculos	Vivero Caucagua, Edo. Miranda	10°17'30.5" N 66°22'36.8" W	INIA-Miranda
Clon colombiano	Criollo colombiano	Tubérculos	Universidad Pontificia Bolivariana, sede Montería, Colombia	8°48'16.9" N 75°51'02.7" W	Ing. Eder Durango

A los clones de ñame también se les puede llamar accesiones. Según Aguirre (2014) una accesión es una muestra viva de una planta, cepa o población mantenida en un banco de germoplasma para su conservación y uso.

En el banco de germoplasma, el ciclo vegetativo de las plantas de ñame estuvo determinado por seis etapas: la latencia de los tubérculos, la germinación de los brotes, el crecimiento vegetativo, la formación de los tubérculos, el marchitamiento de la planta y cosecha de los tubérculos (Rodríguez, 2000). En cada etapa se registraron algunas características morfológicas importantes que se mencionan a continuación.

Durante el periodo de latencia, los tubérculos de los clones de ñame se mantuvieron en condiciones de invernadero durante dos meses. Estas condiciones favorecieron la aparición de los primeros grelos o brotes (comúnmente llamados "apicales") de apariencia cerosa y con una longitud promedio de 5 a 10 cm (**Figura 4**).

Según Ovono y col. (2010) los agricultores son expertos en manipular la duración de la latencia con el propósito de sincronizar el periodo de crecimiento y producir más de una generación por año. Barker y col. (1999) mencionan que debido a que el ñame se comercializa predominantemente como tubérculos frescos, la latencia prolongada es muy importante para su conservación en los anaqueles. Por lo tanto, un largo periodo de latencia en los tubérculos es un atributo deseable en programas de mejoramiento, pero complica el uso de los tubérculos que son utilizados como semilla para propagación.

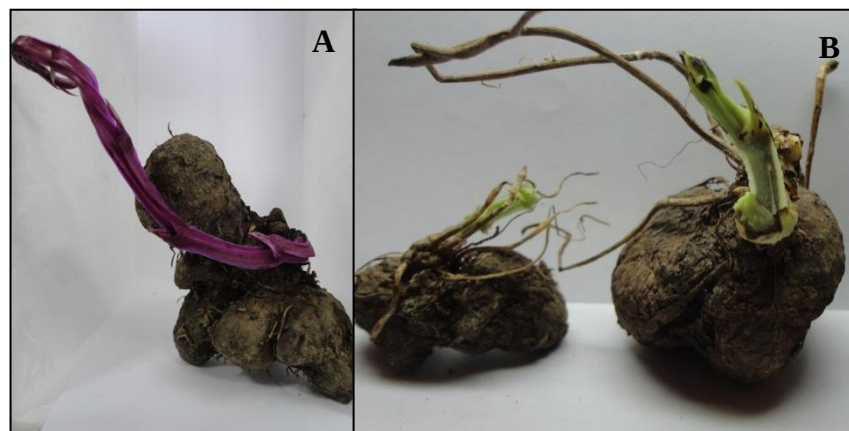


Figura 4. Tubérculos de (A) clon D2 y (B) clon D13, luego de dos meses guardados en bolsas de papel bajo condiciones de invernadero.

Un mes después de la siembra de los tubérculos de ñame se evidenciaron las plántulas jóvenes con hojas muy pequeñas y delgadas, de color verde y epidermis cerosa. Durante los siguientes meses, las plantas mostraron un crecimiento exponencial con tallos gruesos

(algunos alados) y abundantes hojas de gran tamaño y con una coloración verde intensa. Se presume que en esta fase inició la tuberización. Según Rodríguez (2000) en esta etapa la tasa fotosintética es máxima y la planta exhibe el mayor crecimiento de sus órganos vegetativos pero también es considerado un periodo crítico en donde las condiciones ambientales tienen una marcada influencia en la producción de los tubérculos.

Dos meses antes de la cosecha de los tubérculos, las plantas mostraron marchitez en sus hojas y sus tallos comenzaron a declinar. Está reportado que en esta fase los tubérculos crecen significativamente mientras que la parte aérea de la planta cesa su crecimiento (González, 2012). Finalmente, luego de ocho meses de cultivo se procedió a la cosecha de los tubérculos y a su almacenamiento como semilla para la próxima siembra.

3.2 Caracterización morfológica de seis clones de ñame del banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal

Durante el crecimiento de las plantas el uso de los soportes permitió registrar uno de los descriptores más importantes en la caracterización morfológica de ñame: la modalidad de trepado de la planta. Los tallos de los seis clones de ñame (clon D2, clon D7, clon D8, clon D13, clon colombiano y clon venezolano) mostraron una modalidad de trepado hacia la derecha (**Figura 5**). González (2012) comenta que los tallos de las plantas de ñame son delgados y crecen en forma de espiral, siendo posible reconocer la especie de acuerdo con la dirección que estos tomen. Las plantas de *Dioscorea alata*, *D. rotundata* y *D. cayenensis* enrollan sus tallos hacia la derecha mientras que las plantas de *Dioscorea bulbifera*, *D. esculenta* y *D. trifida* enrollan sus tallos hacia la izquierda.

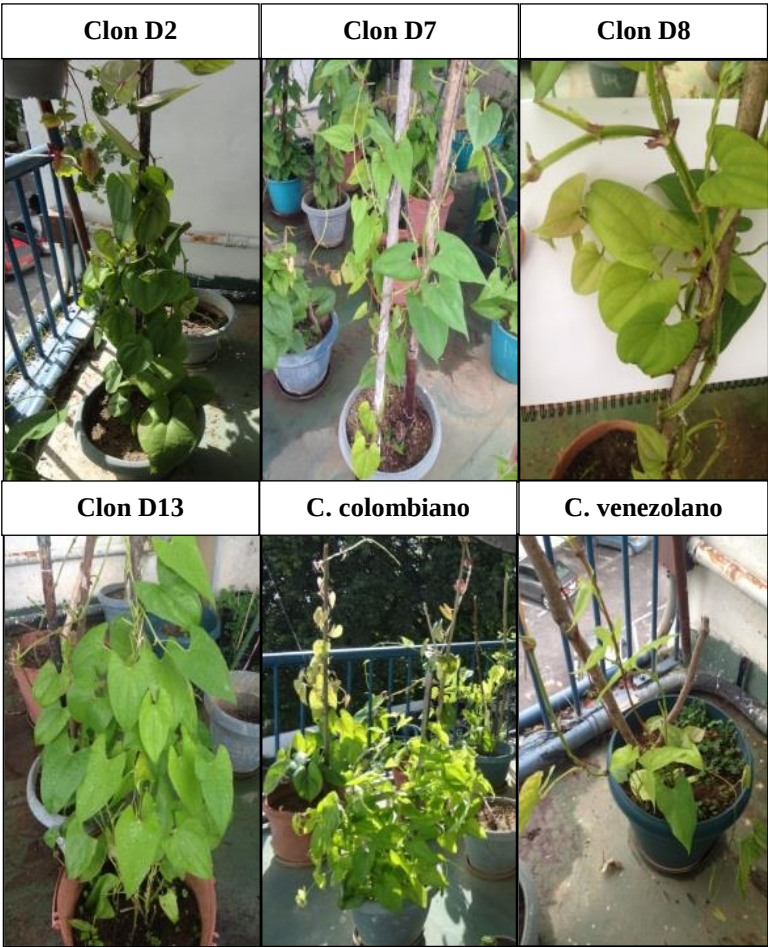


Figura 5. Plantas de ñame ubicadas en el vivero del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.

Para la caracterización morfológica de los clones de ñame se registraron 90 descriptores pero solo 43 de ellos aportaron información relevante para evaluar la diversidad morfológica entre los clones. López (1999) comenta que el número de datos que se pueden tomar durante la caracterización es infinito, pero una buena descripción de las plantas no está determinada por el número de variables descritas, sino por la utilidad práctica de las variables y su precisión.

3.2.1 Descriptores morfológicos relacionados con el tallo de los seis clones de ñame

Los tallos de los clones de ñame comparten algunas características similares; por ejemplo, todos son de color verde y no poseen espinas; sin embargo, poseen otras características que los diferencian (**Tabla 5**), entre ellas podemos mencionar la presencia o ausencia de cera en el tallo joven y maduro, la presencia o ausencia de alas y el color que exhiben estas prolongaciones. El clon D13 es el único clon que no posee alas en el tallo, en

el clon D2 se pueden observar alas de color morado, en el clon colombiano y venezolano las alas son de color verde y en el clon D8 las alas son verdes con bordes morados (**Figura 6**). Algunos autores han reportado que las alas son una adaptación que favorece el hábito trepador (Dumet y Ogunsola, 2008). Estas prolongaciones pueden medir menos de 1 mm (clon D7 y clon colombiano) o entre 1 a 2 mm (clon D2, clon D8 y clon venezolano).

Según Martin (1976) las variedades de *D. alata* se caracterizan por tener tallos con alas típicamente membranosas y a menudo onduladas. En algunas variedades las alas se reducen o están ausentes pero los tallos suelen ser bastante espinosos con las espinas en línea recta representando el ala. Los tallos de los clones estudiados comparten las características de presencia de alas membranosas, onduladas y en algunos casos ausentes; sin embargo, ninguno de ellos desarrolló espinas en sus tallos.

Otras características medidas fueron el diámetro del tallo maduro (entre 0,3 y 0,5 cm), número de tallos maduros por planta (entre 2 y 7), el número de entrenudos hasta la primera ramificación (entre 2 y 6) y el número de ramificaciones en el tallo maduro (entre 2 y 5).

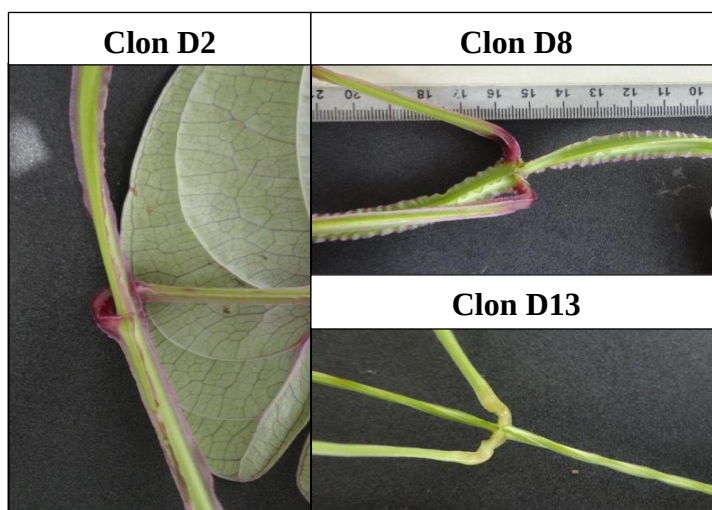


Figura 6. Detalle de la presencia/ausencia de alas en el tallo maduro y el color de dichas prolongaciones en las plantas de ñame.

Tabla 5. Descriptores relacionados con los tallos de los seis clones de ñame.

Características	Clones					
	D2	D7	D8	D13	CC	CV
Ausencia/presencia de cera en el tallo joven	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
Ausencia/presencia de alas en el tallo joven	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente
Color de las alas del tallo joven	Morados	Morados	Verde con bordes morados	N/A	Verde	verde
Número de tallos maduros por planta	2	5	4	3	7	3
Número de entrenudos hasta la primera ramificación	6	2	4	2	4	2
Número de ramificaciones en el tallo maduro	4	2	2	5	4	2
Diámetro del tallo maduro (cm)	0,3	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5
Ausencia/presencia de cera en el tallo maduro	Ausente	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente
Ausencia/presencia de alas en el tallo maduro	Presente	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente
Tamaño de las alas en el tallo maduro	1-2 mm	<1 mm	1-2 mm	N/A	< 1 mm	1-2 mm
Color de las alas del tallo maduro	Morado	Morado	Verdes con bordes morados	N/A	Verde	Verde
Ausencia/presencia de crestas en el tallo maduro	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente

3.2.2 Descriptores morfológicos relacionados con las hojas de los seis clones de ñame

Los clones de ñame también comparten algunas características similares con relación a la morfología de sus hojas entre las que se pueden mencionar: hojas simples de color verde claro en su madurez y con bordes enteros, sin embargo son más las características que los diferencian (**Tabla 6**).

Tabla 6. Descriptores relacionados con las hojas de los seis clones de ñame.

Características	Clones					
	D2	D7	D8	D13	CC	CV
Color de las hojas jóvenes	Verde morado	Verde morado	Verde morado	Verde claro	Verde claro	Verde claro
Color del borde de las hojas jóvenes	Verde	Morado	Verde	Verde	Verde	Verde
Color de la nervadura de la hoja joven	Morado clara	Morado claro	verde	verde	Amarillento	Verde
Color del pecíolo de la hoja joven	Todo verde, morado en ambas puntas	Morado	Verde	Verde	Verde	Verde
Color del ala del pecíolo de la hoja joven	Morado	Morado	Verde	N/A	Verde	Verde
Posición de las hojas maduras	Alternas en la base/opuestas más arriba	Opuestas	Opuestas	Opuestas	Opuestas	Opuestas
Lobulado de las hojas maduras	Lobulado poco profundo	Lobulado poco profundo	Lobulado poco profundo	Lobulado poco profundo	Lobulado profundo	Lobulado poco profundo
Color de la nervadura de la hoja madura (haz)	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarillenta	Verde
Color de la nervadura de la hoja madura (envés)	Verde	Morada	Verde	Verde	Amarillenta	Verde
Forma de la hoja madura	Sagitiforme ancha	Sagitiforme ancha	Cordiforme	Sagitiforme ancha	Sagitiforme larga	Sagitiforme larga
Hoja madura doblada hacia arriba a lo largo del nervio medial	Poco doblada	Poco doblada	Poco doblada	Poco doblada	Muy doblada	Muy doblada
Posición de la parte más ancha de la hoja madura	Medio	Tercio inferior	Tercio inferior	Tercio inferior	Tercio inferior	Medio
Longitud de la punta de la hoja madura	> 5mm	> 5mm	> 5mm	> 5mm	< 2mm	2-5 mm
Longitud del pecíolo de la hoja madura	6-9 cm	6-9 cm	≤ 5 cm	6-9 cm	6-9 cm	6-9 cm
Color del pecíolo de la hoja madura	Todo verde, morado en ambas puntas	Todo verde, con la base morada	Todo verde, con la base morada	Verde	Verde	Verde
Color del ala del pecíolo de la hoja madura	Verde con bordes morados	Verde con bordes morados	Verde con bordes morados	N/A	Verde	Verde
Ausencia/presencia de estípulas en la hoja madura	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Presente

La forma de la hoja en los clones estudiados varía entre cordiformes (Clon D8), sagitiformes anchas (Clon D2, Clon D7 y clon D13) y sagitiformes largas (Clon venezolano y clon colombiano) (**Figura 7**). Las nervaduras en las hojas maduras son de color verde, excepto la de clon colombiano que presenta nervaduras amarillentas. Las nervaduras de las hojas jóvenes pueden presentar una coloración morada clara, como es el caso del clon D2 y clon D7.

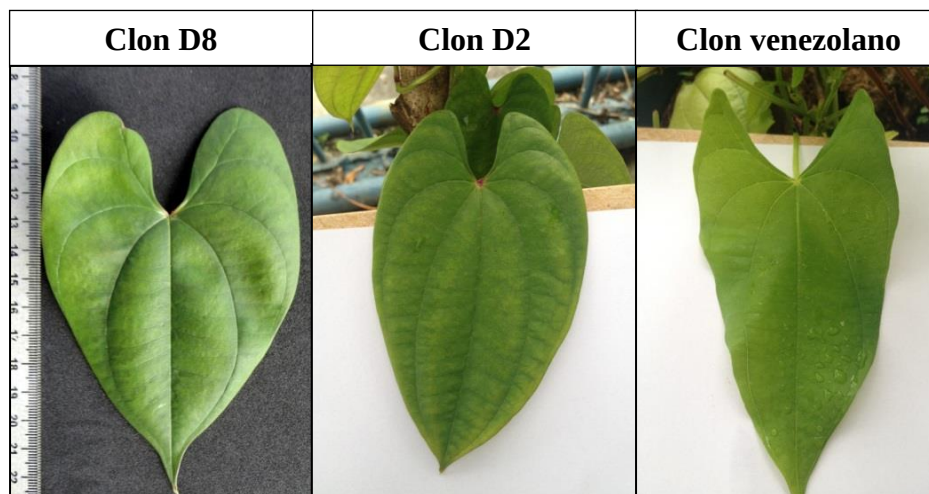


Figura 7. Forma de la hoja del clon D8, clon D2 y clon venezolano.

Adicionalmente, entre los clones de ñame encontramos distintos colores de pecíolo en hojas jóvenes y maduras. Por ejemplo, las hojas jóvenes de clon D7 y clon D8 mostraron pecíolos de color morado y verde, respectivamente. Sin embargo en las hojas maduras el pecíolo es de color verde con la base morada. El color del pecíolo en el resto de los clones no varía según la edad y se mantiene siempre verde y morado en ambas puntas (clon D2) o completamente verde (clon D13, clon colombiano y clon venezolano).

Los clones de ñame estudiados poseen hojas cuyos pecíolos pueden medir entre 6 a 9 cm de longitud, excepto el clon D8 cuyo pecíolo mide menos de 5 cm. Al respecto León (1987) comenta que las hojas de *D. alata* poseen pecíolos muy largos con alas bastante amplias, produciendo un aspecto característico. El pecíolo de las hojas maduras de los clones D2, D7 y D8 presentan las alas de color verde con bordes morados, mientras que el pecíolo de las hojas maduras del clon venezolano y clon colombiano presenta alas de color verde. El pecíolo del clon D13 no presenta alas (**Figura 8**).

Las hojas de los clones de ñame crecen en disposición opuesta al tallo, excepto el clon D2 que presenta hojas alternas en la base del tallo y opuestas más arriba. Esta característica también fue reportada por Jiménez y Hernández (2009) quienes comentan que la disposición foliar en los tallos de *D. alata* es usualmente opuesta pero en algunas variedades suelen estar alternas.

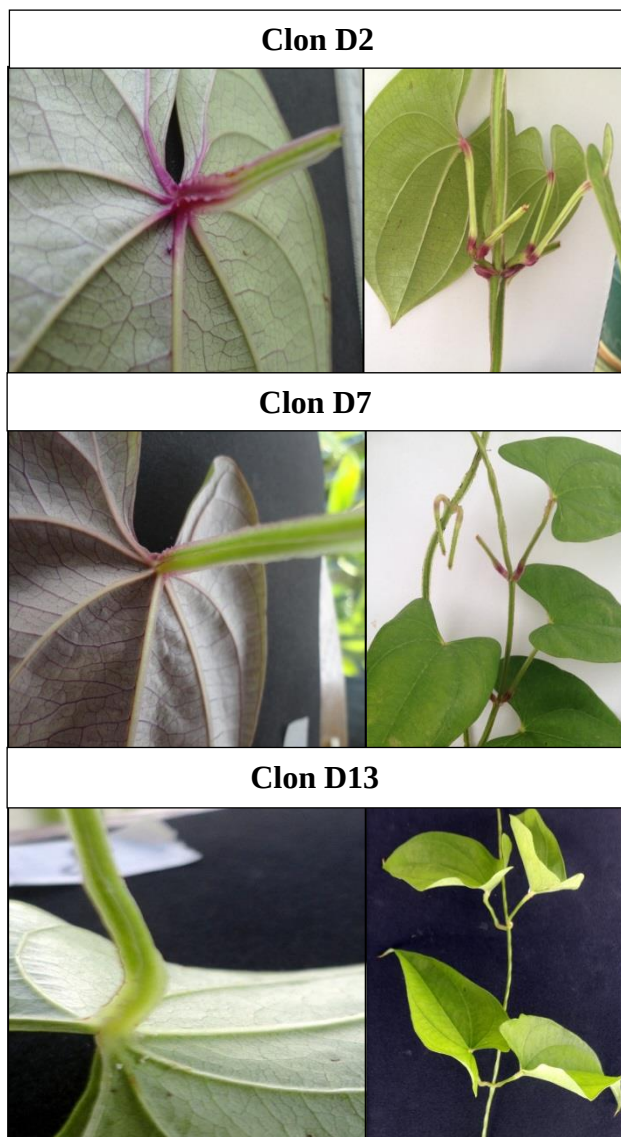


Figura 8. Detalle del color del pecíolo de las hojas de clon D2, clon D7 y clon D13.

3.2.3 Descriptores morfológicos relacionados con los tubérculos de los seis clones de ñame

El tamaño de los tubérculos de los clones de ñame estudiados oscila entre 7,5 a 15,6 cm de ancho con diversas formas desde cilíndrica, redonda o irregular. Los clones D2, D7 y venezolano exhiben tubérculos ramificados, mientras que los clones D8, D13 y colombiano poseen tubérculos enteros sin ramificaciones. Todos los clones de ñame poseen pocas raicillas en la superficie del tubérculo, excepto el clon D8. González (2012) reporta que los tubérculos de *D. alata* son extremadamente variables y el número de posibles formas casi interminable. Estos órganos pueden o no estar ramificados, con pocas o muchas ramificaciones, ya sea del mismo tamaño que el tubérculo principal o más pequeñas.

El color de la pulpa de los tubérculos también fue un descriptor importante para evaluar la diversidad morfológica: el tubérculo del clon D2 resalta por su pulpa de color morado debido a un alto contenido de antocianinas, mientras que la pulpa de los tubérculos del resto de los clones mostró una coloración entre blanca, blanca amarillenta o amarillenta (**Figura 9**). La pulpa de los tubérculos de los clones D7, D8, D13 y colombiano posee una textura lisa mientras que en el clon D2 y clon venezolano la pulpa es granulosa.

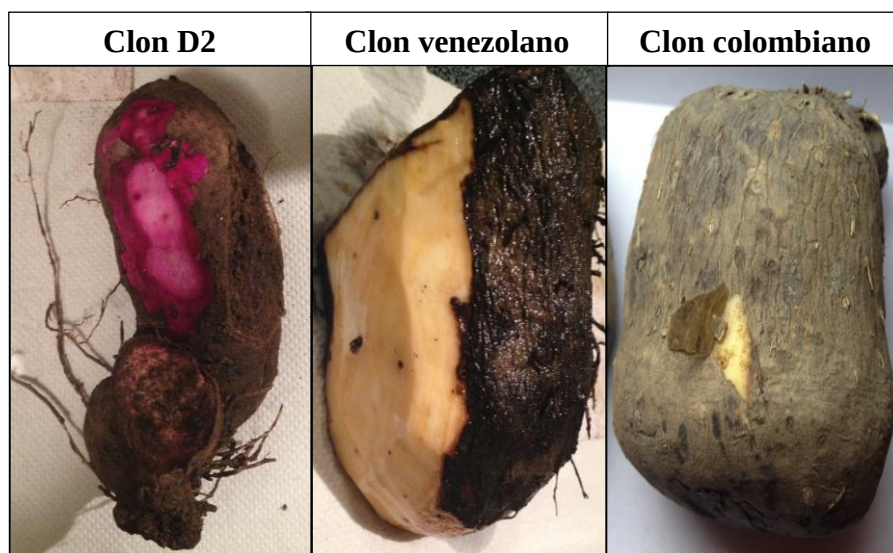


Figura 9. Color de la pulpa de los tubérculos de clon D2, clon venezolano y clon colombiano.

Tabla 7. Descriptores relacionados con los tubérculos de los seis clones de ñame.

Características	Clones					
	D2	D7	D8	D13	CC	CV
Forma del tubérculo	Irregular	Irregular	Cilíndrico	Redondo	Redondo	Cilíndrico
Tendencia del tubérculo a la ramificación	Ligeramente ramificado	Ramificado	No ramificado	No ramificado	No ramificado	Ligeramente ramificado
Lugar donde se ramifica el tubérculo	Tercio superior	Medio	N/A	N/A	N/A	Tercio superior
Anchura del tubérculo (cm)	9	8,33	7,5	9,5	14	15,6
Raíces en la superficie del tubérculo	Pocas	Pocas	Muchas	Pocas	Pocas	Pocas
Lugar de las raíces en el tubérculo	Todo el tubérculo	Todo el tubérculo	Todo el tubérculo	Parte superior	Parte superior	Todo el tubérculo
Rugosidad de la superficie del tubérculo	Poca	Poca	Poca	Mucha	Poca	Poca
Ausencia/presencia de las grietas en la superficie del tubérculo	Presente	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente
Color de la piel del tubérculo (debajo de la corteza)	Morado	Amarillo claro	Amarillo claro	Marrón claro	Marrón clara	Amarillo claro
Color de la pulpa en la sección transversal del centro	Morado	Amarrillo	Blanco amarillento	Blanco	Amarillo	Blanco amarillento
Textura de la pulpa	Granulosa	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa	Granulosa
Tiempo de oxidación de la pulpa después de la cosecha	> 2min	1-2 min	< 1 min	> 2min	1-2 min	1-2 min
Color de la oxidación de la pulpa	Gris	Marrón	Marrón	No oxidó	Marrón	Marrón
Cantidad de resina expulsada por el corte del tubérculo	Poca	Mucha	Intermedia	Intermedia	Poca	Poca

3.2.4 Análisis estadístico de los resultados obtenidos

Franco e Hidalgo (2003) mencionan que los métodos estadísticos multivariados más utilizados para evaluar los datos obtenidos de una caracterización morfológica o molecular son el análisis de componentes principales y el análisis de conglomerados. El análisis de componentes principales (ACP) se basa en la transformación de un conjunto de variables originales en otro conjunto de variables independientes no correlacionadas, llamadas componentes principales.

El ACP permite conocer la relación existente entre las variables con el propósito de saber cuáles de ellas están o no asociadas, cómo se distribuyen las accesiones y cuáles se parecen y cuáles no. También permite seleccionar las variables más discriminatorias para limitar el número de mediciones en caracterizaciones posteriores (Martínez, 1995).

En estos análisis el número de componentes principales es igual al número de variables estudiadas, sin embargo, cada uno de ellos posee una varianza asociada que se va acumulando progresivamente hasta alcanzar el 100%. En este sentido, para la discusión de los resultados se toman en cuenta aquellos componentes principales cuya suma de la varianza asociada represente más del 70% de la varianza total (Franco e Hidalgo, 2003).

En nuestra investigación el análisis de componentes principales (**Tabla 8**) reveló que los tres primeros componentes principales representan el 77,88% de la variabilidad que existe entre los seis clones de ñame. El primer componente representa el 38,12%, el segundo el 20,89% y el tercero el 18,86%.

Tabla 8. Análisis de componentes principales

	Axis 1	Axis 2	Axis 3	Axis 4	Axis 5
Eigenvalues	16,393	8,985	8,113	5,907	3,601
Porcentaje de variabilidad	38,124	20,896	18,867	13,738	8,375
Porcentaje de variabilidad total	38,124	59,02	77,887	91,625	100

Para determinar cuáles fueron las variables que poseen mayor poder discriminatorio entre los clones se debe tomar en cuenta los valores propios (autovalores) de cada una de ellas; mientras más altos sean estos, independientemente del signo, más eficientes serán en la discriminación de las accesiones. Las variables con coeficiente negativo (-) significan que están caracterizando en sentido contrario en relación con las variables positivas (+) y viceversa (Martínez, 1995).

El programa estadístico MSVP con el que se realizó el análisis de componentes principales resalta en negrita aquellas variables con mayor poder discriminatorio (**Tabla 9**), entre las que podemos mencionar para el primer eje o componente principal uno: color de las alas en el tallo joven, número de ramificaciones en el tallo maduro, color del peciolo de

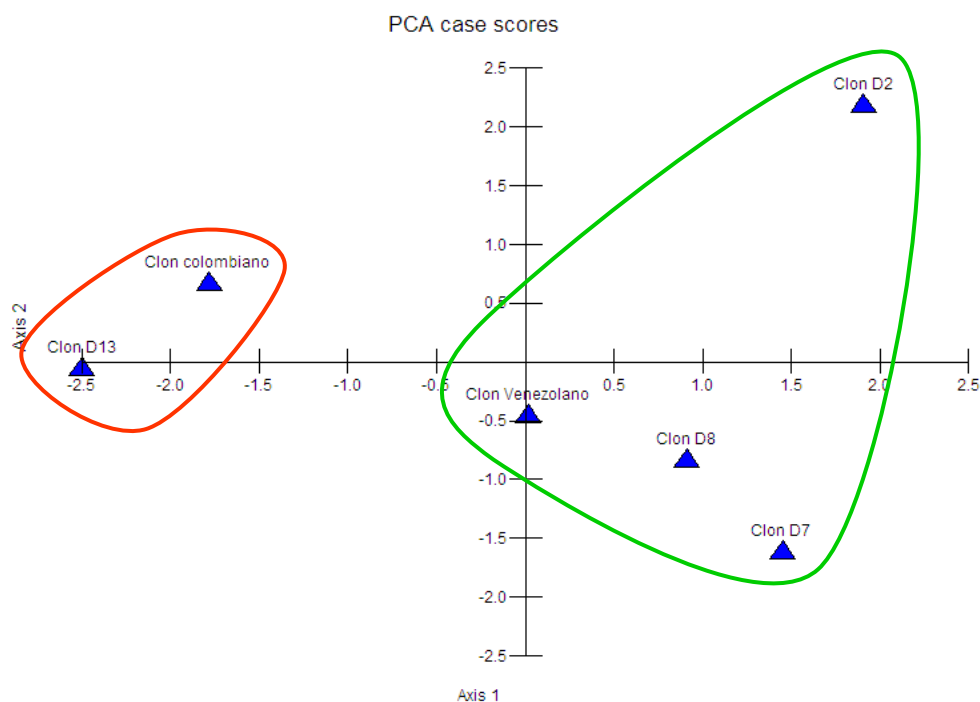
la hoja joven y madura, color del ala del peciolo de la hoja joven y madura, lobulado de las hojas maduras, forma de la hoja madura, posición de la parte más ancha de la hoja madura, lugar de las raíces en el tubérculo, rugosidad de su superficie, ausencia/presencia de grietas, forma del tubérculo, anchura y color de la piel. Para el segundo eje o componente principal dos: número de entrenudos hasta la primera ramificación, diámetro del tallo maduro, ausencia/presencia de cera, posición de las hojas y ausencia/presencia de estípulas. Y para el tercer eje o componente principal tres: ausencia/presencia de alas en el tallo joven y maduro, color de la nervadura de la hoja joven y madura, hoja doblada hacia arriba a lo largo del nervio medio, longitud de la punta de la hoja y color de la oxidación de la pulpa del tubérculo.

Tabla 9. Valores propios (autovalores) de las variables estudiadas representadas en los tres primeros componentes principales.

	Eje 1	Eje 2	Eje 3
Forma del tubérculo	0,241	-0,034	0,021
Tendencia del tubérculo a la ramificación	0,172	-0,025	-0,008
Lugar donde se ramifica el tubérculo	0,169	-0,056	-0,004
Anchura del tubérculo (cm)	-0,111	0,056	-0,228
Raíces en la superficie del tubérculo	0,062	-0,101	0,013
Lugar de las raíces en el tubérculo	0,229	-0,063	-0,003
Rugosidad de la superficie del tubérculo	-0,169	-0,005	0,255
Ausencia/presencia de grietas en la superficie del tubérculo	0,215	-0,020	0,083
Color de la piel del tubérculo (debajo de la corteza)	0,219	-0,103	-0,014
Color de la pulpa en la sección transversal del centro	0,167	0,195	-0,100
Textura de la pulpa	0,103	0,173	-0,029
Tiempo de oxidación de la pulpa después de la cosecha	-0,059	0,189	0,145
Color de la oxidación de la pulpa	0,091	-0,143	-0,286
Cantidad de resina expulsada por el corte del tubérculo	0,034	-0,250	0,170
Ausencia/presencia de cera en el tallo joven	0,078	-0,199	-0,076
Ausencia/presencia de alas en el tallo joven	0,169	0,005	-0,255
Color de las alas del tallo joven	0,231	0,011	-0,079
Número de tallos maduros por planta	-0,079	-0,144	-0,219
Número de entrenudos hasta la primera ramificación	0,089	0,251	-0,061
Número de ramificaciones en el tallo maduro	-0,144	0,229	0,113
Diámetro del tallo maduro (cm)	-0,078	-0,223	-0,210
Ausencia/presencia de cera en el tallo maduro	-0,007	-0,283	0,136
Ausencia/presencia de alas en el tallo maduro	0,169	0,005	-0,255
Tamaño de las alas en el tallo maduro	0,185	0,048	-0,176
Color de las alas del tallo maduro	0,231	0,011	-0,079

Tabla 9. Valores propios (autovalores) de las variables estudiadas representadas en los tres primeros componentes principales. Continuación.

	Eje 1	Eje 2	Eje 3
Ausencia/presencia de crestas en el tallo maduro	0,151	0,135	0,073
Color de las hojas jóvenes	0,215	-0,020	0,083
Color del borde de las hojas jóvenes	0,098	-0,198	0,019
Color de la nervadura de la hoja joven	0,183	-0,021	0,208
Color del pecíolo de la hoja joven	-0,107	-0,292	-0,072
Color del ala del peciolo de la hoja joven	0,215	0,043	-0,085
Posición de las hojas maduras	0,129	0,272	0,079
Lobulado de las hojas maduras	-0,121	0,085	-0,251
Color de la nervadura de la hoja madura (haz)	0,121	-0,085	0,251
Color de la nervadura de la hoja madura (envés)	0,139	-0,190	0,156
Forma de la hoja madura	-0,113	-0,292	-0,013
Hoja madura doblada a lo largo del nervio media	-0,095	0,025	-0,290
Posición de la parte más ancha de la hoja madura	-0,103	-0,173	0,029
Longitud de la punta de la hoja madura	0,120	-0,063	0,298
Longitud del peciolo de la hoja madura	-0,062	0,101	-0,013
Color del pecíolo de la hoja madura	-0,217	-0,064	-0,093
Color del ala del peciolo de la hoja madura	0,222	-0,007	-0,124
Ausencia/presencia de estípulas en la hoja madura	0,120	-0,263	-0,062

**Figura 10.** Distribución de los seis clones de ñame estudiados sobre el primero y segundo componente principal en la caracterización morfológica.

En la **Figura 10** se aprecia la distribución de los clones de ñame sobre los dos primeros componentes principales, representando el 59% de la variabilidad total. De manera preliminar, las variables que tuvieron mayor poder discriminatorio en estos ejes agrupan los clones en dos grupos. Sin embargo, para estudiar la distribución de los clones considerando el aporte de las 43 variables evaluadas se realizó un análisis de conglomerados. Según Franco e Hidalgo (2003), el método de conglomerados o análisis de cluster es un método estadístico que permite clasificar las accesiones de un germoplasma en grupos relativamente homogéneos con base en alguna similitud existente entre ellas. El procedimiento parte de la existencia inicial de un conglomerado para cada accesión que por aproximaciones sucesivas se van uniendo con otros en grupos hasta formar un conglomerado único que las incluye a todas. En el agrupamiento los resultados se presentan en forma de diagrama de árbol, comúnmente conocido como dendrograma.

En esta investigación el dendrograma construido a partir de la matriz de similitud basada en el coeficiente de Jaccard (**Figura 11**) revela la formación de dos grupos pero uno de ellos conformado a su vez por dos subgrupos. El primer subgrupo grupo está conformado por el clon venezolano y el clon D7 los cuales comparten el mayor número de características morfológicas similares por estar separados a una distancia de 0,98, lo cual representa el 98% de similitud. Las características que comparten estos dos clones son: tallos alados de 0,5 cm de diámetro y con presencia de cera, hojas opuestas con lobulado poco profundo y nervaduras de color verde, con un peciolo de 6 a 9 cm de longitud y presencia de estípulas. La superficie del tubérculo es poco rugosa con raicillas y la piel es de color amarillo claro.

El segundo subgrupo está conformado por el clon D8 y el clon D2 separados a una distancia de 0,91 (91% de similitud), con características similares tales como: tallos con alas de 1-2 mm de ancho, ausencia de cera, hojas jóvenes de color verde morado con el borde verde, lobulado poco profundo, nervaduras de color verde, alas de color verde con bordes morados. La superficie de los tubérculos es poco rugosa, con algunas grietas y raicillas.

El tercer grupo está conformado por el clon colombiano y el clon D13 separados a una distancia de 0,76 (76% de similitud). Los tallos de estos clones no poseen cera ni crestas, las hojas jóvenes y el pecíolo son de color verde claro, su posición en el tallo es opuesta y no poseen estípulas. Los tubérculos son redondos sin ramificaciones, con pocas raicillas y sin grietas en su superficie, su piel es de color marrón claro y su pulpa es lisa.

Tabla 10. Índice de similitud basado en el coeficiente de Jaccard para los seis clones de ñame estudiados

	Clon D2	Clon D7	Clon D8	Clon D13	Clon colombiano	Clon venezolano
Clon D2	1,00					
Clon D7	0,91	1,00				
Clon D8	0,91	0,91	1,00			
Clon D13	0,68	0,69	0,73	1,00		
Clon colombiano	0,90	0,86	0,90	0,76	1,00	
Clon venezolano	0,88	0,98	0,88	0,71	0,88	1,00

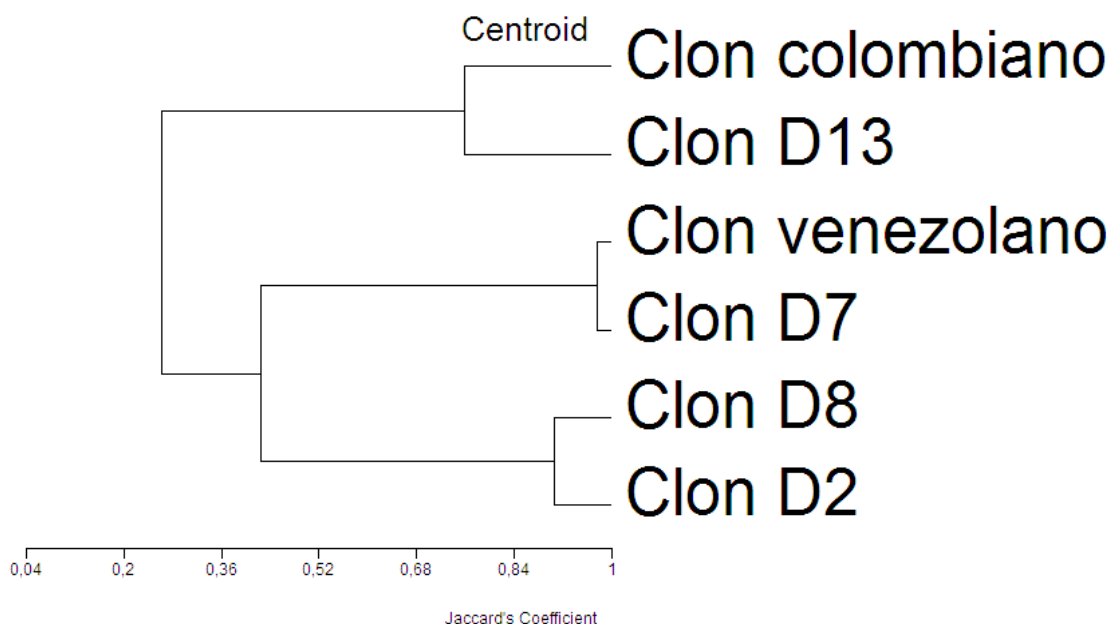


Figura 11. Dendrograma obtenido por el análisis de conglomerados (basado en el coeficiente de Jaccard y con el método de agrupamiento centrado) de 43 descriptores morfológicos estudiados en seis clones de ñame.

Los resultados de esta investigación son similares a los reportados por Castillo y col. (2010) quienes realizaron la caracterización morfológica de ocho cultivares de ñame (*Dioscorea alata* L.) establecidos en los campos de INIA-Barinas, seleccionando 17 variables de la lista de “Descriptores para el ñame (*Dioscorea* spp.)” (IPGRI/IITA, 1997). El análisis de componentes principales evidenció que 75,80% de la varianza total acumulada es explicada por los dos primeros componentes. Las variables asociadas al primer componente fueron largo y ancho de la lámina foliar y longitud del pecíolo y las variables asociadas al segundo componente fueron longitud y diámetro de entrenudos en el tallo. El análisis de conglomerados permitió agrupar los ocho cultivares de ñame en tres grupos debido principalmente a características semejantes en sus hojas.

3.3 Caracterización molecular de seis clones de ñame cultivados *in vitro*.

En los últimos años las técnicas moleculares han permitido complementar la información obtenida a través de la caracterización morfológica. Entre las técnicas más usadas para caracterizar la variabilidad genética existente en los bancos de germoplasma se encuentra la Amplificación de Fragmentos de Longitud Polimórfica (AFLP) que tiene la gran ventaja de ser utilizada sin previo conocimiento del genoma.

3.3.1 Extracción de ADN

Durante el proceso de extracción de ADN de ñame se presentan algunas limitaciones tales como la contaminación con ARN y la presencia de mucílagos que pueden afectar negativamente la cantidad y pureza del ADN extraído. Afortunadamente, el protocolo basado en el método de Doyle y Doyle (1990) modificado por Oropeza y col. (2006) fue eficiente para lograr obtener un material genético de buena calidad. Estas modificaciones incluyeron un tratamiento con RNAsa “A” que permitió eliminar la contaminación con ARN, un tratamiento con solución limpiadora (etanol 76% en 10 mM de acetato de amonio (NH₄COOH)) y la precipitación del mucílago con acetato de amonio 7.5 M. Este paso es sumamente importante debido a que la presencia de mucílagos en la muestra impide la posterior amplificación del ADN.

En esta investigación, para minimizar aún más los inconvenientes asociados a la presencia de sustancias mucilaginosas en las muestras de ADN o la contaminación con

ADN de otro organismo, la extracción se realizó a partir de vitroplantas sanas de dos meses de edad lo cual facilitó la maceración del tejido y permitió obtener una gran cantidad de material genético.

Según Sambrook y col. (1989) para que un protocolo de extracción de ADN pueda ser considerado como eficiente, la lectura de las muestras en un espectrofotómetro debe presentar valores entre 1,8 y 2 en la relación 260/280 nm. En la **Tabla 11** se muestran los valores de concentración y pureza del ADN extraído por duplicado a partir de vitroplantas de ñame y de papa. Aunque la relación 260/280 muestra valores menores a lo reportado por Sambrook y col. (1989) se obtuvo suficiente cantidad de ADN. Además se comprobó su integridad en geles de agarosa al 0,8% resultando bandas nítidas (de aproximadamente 21.226 pb) para la mayoría de los clones (**Figura 12**). Tomando en consideración estos dos criterios, se decidió seleccionar las muestras D2, D7, D8, D13, CC, CV' y AN para su caracterización molecular mediante el uso de marcadores moleculares AFLP.

Tabla 11. Valores de concentración y pureza de ADN de seis clones de ñame y dos variedades de papa

Muestra	Abs 260	Abs 280	Abs 260/280	µg/ml ADN	ADN x FD (ng/µl)
D2	0,019	0,013	1,462	0,727	190
D2'	0,046	0,035	1,314	1,633	460
D7	0,025	0,020	1,250	0,853	250
D7'	0,058	0,047	1,234	1,956	580
D8	0,027	0,022	1,227	0,906	270
D8'	0,031	0,025	1,240	1,050	310
D13	0,014	0,012	1,167	0,449	140
D13'	0,018	0,013	1,385	0,664	180
CC	0,012	0,009	1,333	0,431	120
CC'	0,018	0,014	1,286	0,628	180
CV	0,016	0,013	1,231	0,538	160
CV'	0,020	0,013	1,345	0,538	200
AN	0,123	0,073	1,684	2,012	1230
AN'	0,039	0,041	0,951	1,102	390
G	0,122	0,082	1,487	2,010	1220
G'	0,112	0,074	1,513	2,002	1120

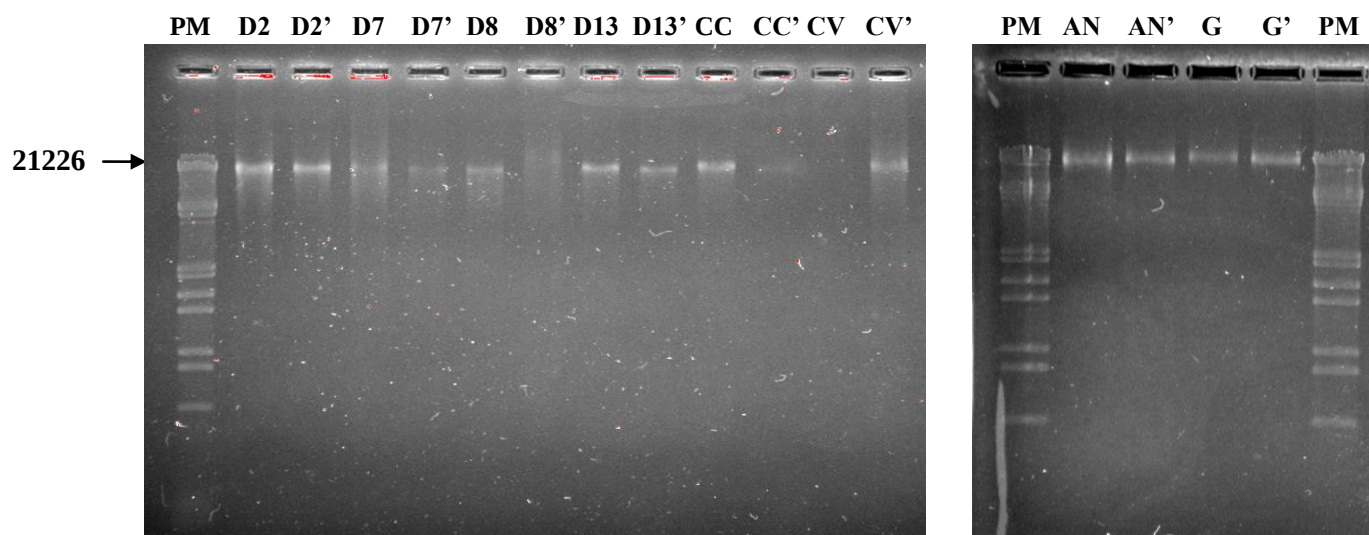


Figura 12. Integridad del ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D13, CC, CV) y dos variedades de papa (‘arbolona negra’ AN y ‘granola’ G) en un gel de agarosa al 0,8 %. PM. Marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoRI+ HindIII

3.3.2 Polimorfismos de los AFLP

Como resultado de la caracterización molecular con marcadores AFLP se registraron 219 fragmentos amplificados con un tamaño comprendido entre 250 a 8000 pb. Las 15 combinaciones de iniciadores empleadas amplificaron 63 bandas monomórficas y 156 polimórficas entre los seis clones de ñame, reflejando un alto porcentaje de polimorfismo intraespecífico de 71,23 %.

Para la construcción de la matriz de ausencia/presencia de bandas se tomó como criterio de selección únicamente aquellas bandas de mayor intensidad para minimizar la subjetividad al momento de decidir la presencia o no de una banda en una determinada posición, sin embargo en el registro fotográfico de los geles (**Figuras 13, 14 y 15**) se aprecia la amplificación de una gran cantidad de bandas por cada par de iniciadores lo cual garantiza que las combinaciones empleadas fueron lo suficientemente sensibles para detectar diferencias entre los clones de ñame.

En la **Tabla 12** se aprecia el número de bandas amplificadas (monomórficas y polimórficas) por cada par de iniciadores. Según Rivera y col. (2012) las combinaciones con mayor poder discriminatorio entre las accesiones son aquellas que hayan generado el mayor número de bandas amplificadas con altos porcentajes de polimorfismo. En nuestra

investigación la mayoría de las combinaciones empleadas generaron polimorfismos muy altos (mayores al 70%) pero de todas ellas la combinación que posee el mayor poder discriminatorio es Ase 08-Taq 07, generando 15 bandas amplificadas con un 93,33% de polimorfismo entre los clones.

Para efectos de reducción de costos, para futuras investigaciones relacionadas con la caracterización molecular de ñame mediante AFLP se recomienda descartar las siete combinaciones que arrojaron polimorfismos menores al 70% (Ase 01-Taq 02, Ase 06- Taq 09, Ase 08-Taq 02, Ase 08-Taq 03, Ase 08-Taq 05, Ase 09-Taq 03, Ase 09-Taq05) debido a que aportan poca información sobre la variabilidad genética de los genotipos estudiados.

Los resultados de nuestra investigación coinciden con Wendawek y col. (2013) quienes evaluaron la diversidad genética de 43 accesiones de ñame silvestres y cultivados de *Dioscorea* spp. mediante tres combinaciones de iniciadores AFLP, reportando 158 fragmentos amplificados lo que corresponde a un 78% de polimorfismo. Rivera y col. (2011) también realizaron la caracterización molecular de accesiones de ñame (*Dioscorea* spp.) de la región caribe colombiana mediante tres combinaciones de iniciadores AFLP reportando 206 fragmentos amplificados lo que corresponde a 88,56 % de polimorfismo.

Tabla 12. Polimorfismos en los clones de ñame obtenidos con 15 combinaciones de iniciadores AFLP.

Combinación de iniciadores	N° de bandas amplificadas	N° de bandas monomórficas	N° de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo (%)
Ase 01-Taq 02	20	11	9	45,00
Ase 04-Taq 14	11	2	9	81,82
Ase 06- Taq 09	16	6	10	62,50
Ase 06- Taq 16	14	3	11	78,57
Ase 08-Taq 02	17	6	11	64,71
Ase 08-Taq 03	13	4	9	69,23
Ase 08-Taq 05	19	9	10	52,63
Ase 08- Taq 07	15	1	14	93,33
Ase 08- Taq 09	22	3	19	86,36
Ase 08- Taq 16	20	2	18	90,00
Ase 09-Taq 02	11	2	9	81,82
Ase 09-Taq 03	10	5	5	50,00
Ase 09-Taq 05	7	3	4	57,14
Ase 09-Taq 12	15	4	11	73,33
Ase 09-Taq 14	9	2	7	77,78
Total	219	63	156	71,23

Como era de esperarse, en el registro fotográfico de los geles se aprecia claramente la diferencia entre el patrón de bandas generado para ‘arbolona negra’ en comparación al obtenido con los clones de ñame (**Figuras 13, 14 y 15**). De las 219 bandas amplificadas 14 fueron monomórficas y 205 polimórficas con los seis clones de ñame, reportando un polimorfismo interespecífico de 93,60 %.

Otro resultado muy interesante es la variación en el patrón de bandas registrada para el genotipo de clon colombiano en comparación a la observada para el resto de los clones (**Figura 13, 14 y 15**). Para este clon se registraron 105 bandas polimórficas con un 47,94 % de polimorfismo intraespecífico.

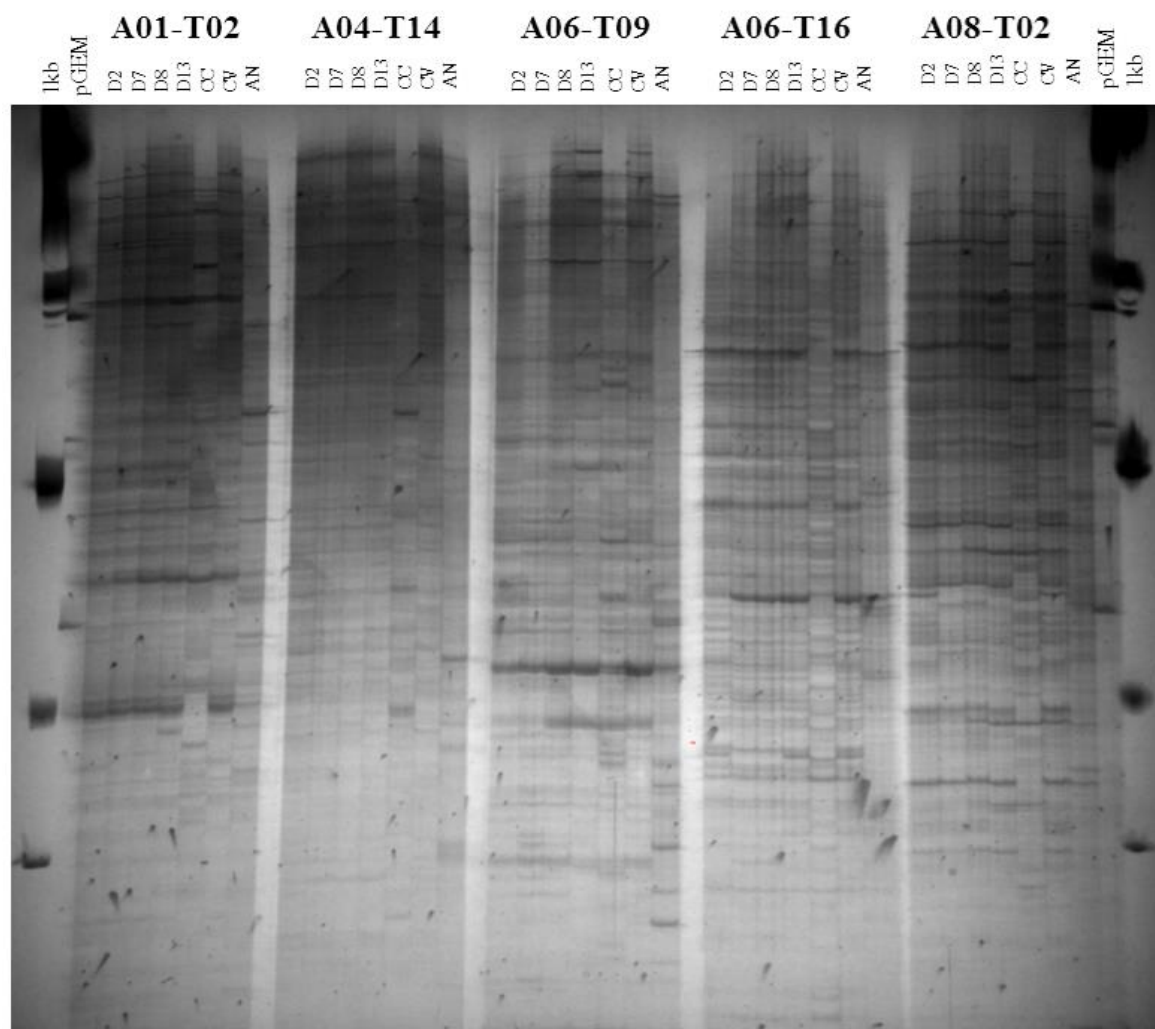


Figura 13. Registro fotográfico de electroforesis de los productos de amplificación diferencial por PCR con 5 pares de iniciadores (Ase 01-Taq 02; Ase 04-Taq 14; Ase 06-Taq 09; Ase 06-Taq 16; Ase 08-Taq 02), ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D13, CC, CV) y ADN de papa, var. ‘Arbolona negra’ (AN). Marcadores de peso molecular: 1 kb y pGEM de Promega.

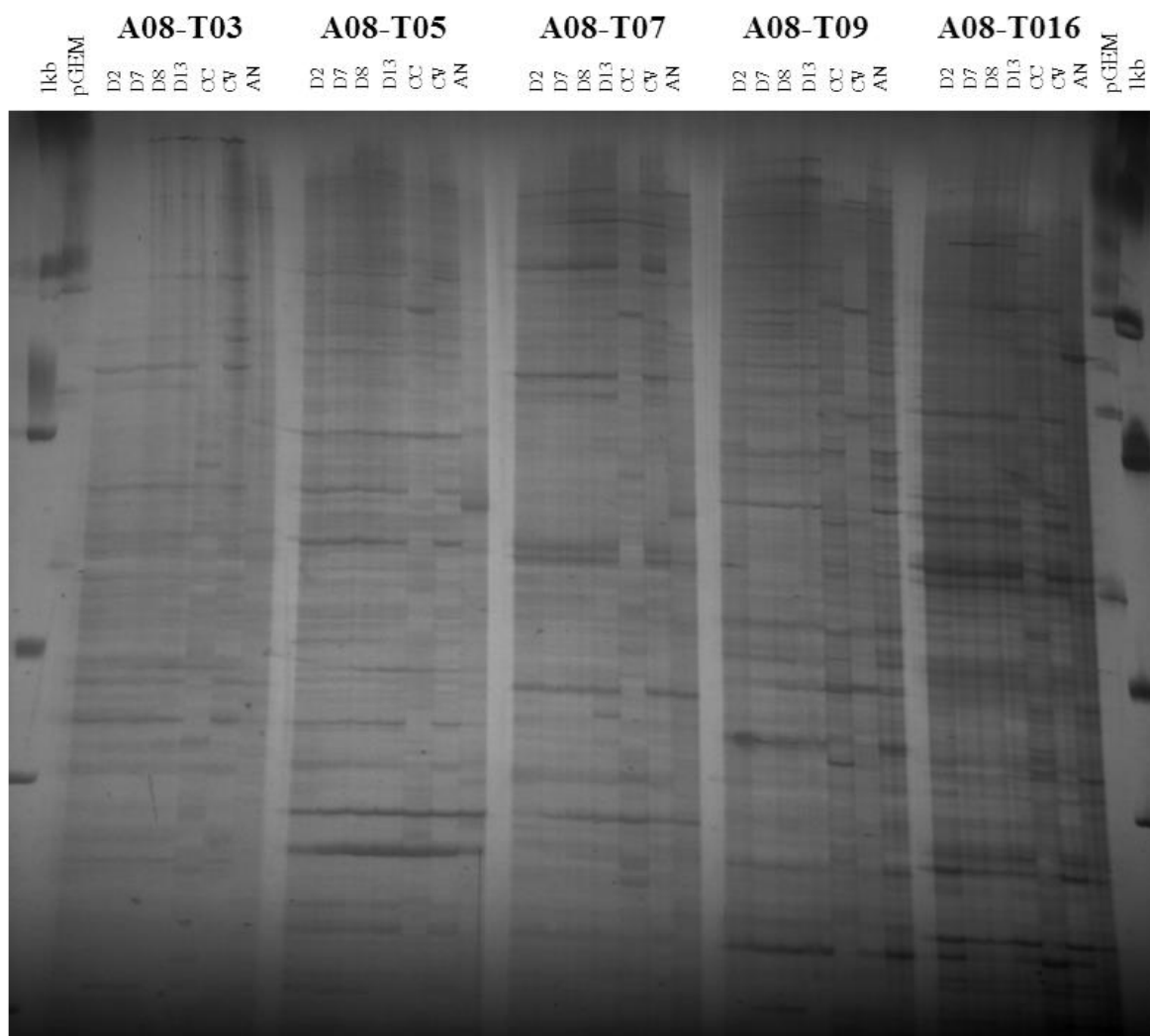


Figura 14. Registro fotográfico de electroforesis de los productos de amplificación diferencial por PCR con 5 pares de iniciadores (Ase 08-Taq 03; Ase 08-Taq 05; Ase 08-Taq 07; Ase 08-Taq 09; Ase 08-Taq 16), ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D13, CC, CV) y ADN de papa, var. ‘Arbolona negra’ (AN). Marcadores de peso molecular: 1 kb y pGEM de Promega

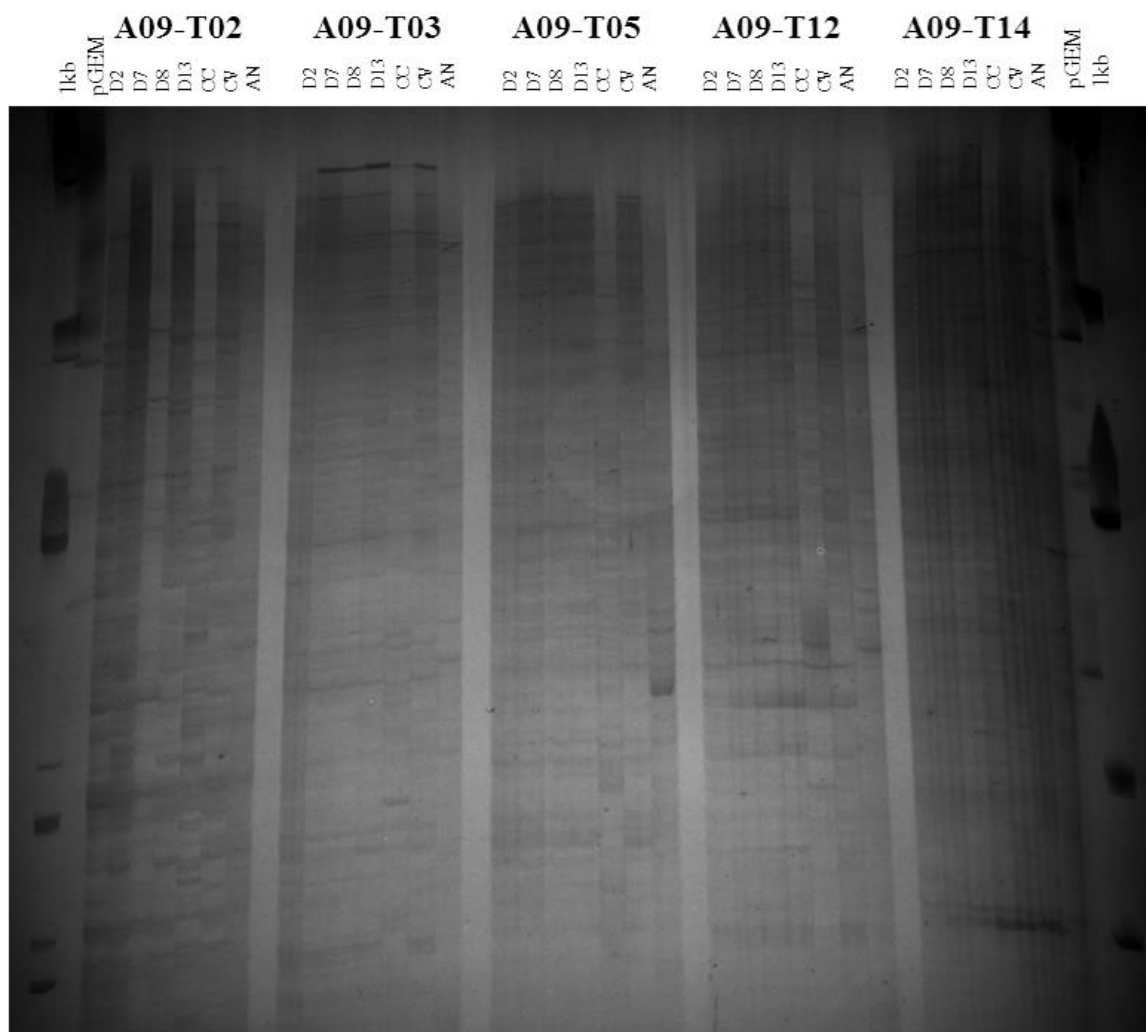


Figura 15. Registro fotográfico de electroforesis de los productos de amplificación diferencial por PCR con 5 pares de iniciadores (Ase 09-Taq 02; Ase 09-Taq 03; Ase 09-Taq 05; Ase 09-Taq 12; Ase 09-Taq 14), ADN de seis clones de ñame (D2, D7, D8, D13, CC, CV) y ADN de papa, var. ‘Arbolona negra’ (AN). Marcadores de peso molecular: 1 kb y pGEM de Promega.

3.3.3 Análisis estadístico de los resultados obtenidos

El análisis estadístico de los productos de amplificación generados con 15 combinaciones de iniciadores permitió la construcción de una matriz de similitud basada en el coeficiente de Jaccard, con valores que oscilan entre 0,218 y 0,923 (**Tabla 13**). El dendrograma generado a partir de esta matriz y siguiendo el método de agrupamiento UPGMA mostró claramente la formación de tres grupos.

Tabla 13. Índice de similitud basado en el coeficiente de Jaccard para seis genotipos de ñame

	Clon D2	Clon D7	Clon D8	Clon D13	Clon colombiano	Clon venezolano	‘Arbolona negra’
Clon D2	1						
Clon D7	0,911	1					
Clon D8	0,841	0,923	1				
Clon D13	0,793	0,848	0,921	1			
Clon colombiano	0,289	0,293	0,318	0,323	1		
Clon venezolano	0,761	0,796	0,847	0,855	0,326	1	
‘Arbolona negra’	0,257	0,277	0,290	0,275	0,218	0,268	1

El grupo 1 está conformado por el clon venezolano, clon D13, clon D8, clon D7 y clon D2. Los clones D8 y D7 poseen el mayor índice de similitud (0,923). A este subgrupo se le une el clon D13 cuyo índice de similitud resultó ser 0,885 y el clon D2 con un índice de 0,848. El ADN del clon venezolano también comparte algunas características similares con los genotipos del resto de los clones registrando un índice de similitud de 0,815.

El análisis estadístico comprueba que aunque el clon colombiano también pertenece a la especie *D. alata* su genotipo es muy distinto al del resto de los clones, separándolo en un segundo grupo con un índice de similitud igual a 0,310. Por último, el genotipo de ‘arbolona negra’ conforma el grupo más lejano (grupo 3) y por lo tanto el menos relacionado con los genotipos de ñame, como era de esperarse.

La caracterización molecular de los seis clones de ñame y el análisis estadístico permitió asegurar que no existen duplicados en la colección y que cada clon en realidad corresponde a una variedad distinta dentro de la especie *D. alata*.

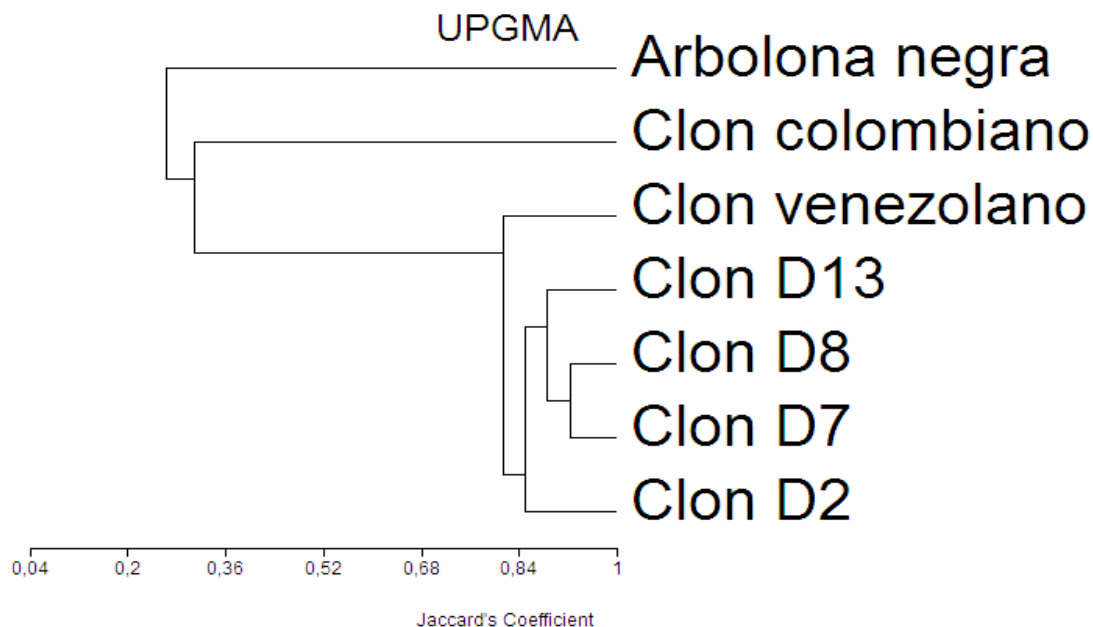


Figura 16. Dendrograma obtenido del análisis de conglomerados (basado en el coeficiente de Jaccard y con el método de agrupamiento UPGMA) de 219 bandas amplificadas generadas con 15 combinaciones de iniciadores AFLP.

3.4 Análisis de la relación entre la caracterización morfológica y la caracterización molecular

Campos y Seguel (2000) comentan que la dificultad en diferenciar accesiones solo con base en caracteres fenotípicos conlleva a la conservación de numerosos duplicados en los bancos de germoplasma. En términos prácticos esto reduce la eficiencia de manejo del germoplasma e incrementa los costos de mantenimiento, regeneración y caracterización. La caracterización molecular permite estimar la variabilidad genética de los individuos y detectar diferencias entre las accesiones que se consideran similares con base en descriptores morfológicos, eliminando de esta manera los duplicados que existan en una colección de germoplasma (Bustamante y col., 2001).

En estudios taxonómicos, filogenéticos y de diversidad genética del ñame, complementar la caracterización morfológica con la caracterización molecular permite obtener información sobre la diversidad del germoplasma para ser utilizado por los fitomejoradores en el desarrollo de variedades mejoradas que combinen altos rendimientos, tolerancia a la antracnosis y de buena adaptación en el mercado (Rivera y col., 2012).

En esta investigación se realizó un análisis de conglomerados (**Tabla 14**) con el propósito de agrupar los resultados generados de la caracterización morfológica y molecular para generar un dendrograma consenso el cual arrojó la formación de dos grupos, uno de ellos conformado a su vez por dos subgrupos.

El primer subgrupo con un índice de similitud de 0,91 está conformado por los clones D7 y D8, lo que quiere decir que comparten el mayor número de características morfológicas y moleculares similares en comparación con el resto de los clones. Entre las características morfológicas comunes se pueden mencionar: presencia de alas y cera en el tallo maduro, hojas opuestas de color verde con tonalidades moradas, la longitud de la punta de la hoja es mayor a 5mm con un lobulado poco profundo, la superficie de los tubérculos es poco rugosa con algunas grietas, el color de la piel es amarillo claro y la textura de la pulpa es lisa. Todas estas características describen al clon D8 y al clon D7 pero quizás la característica más importante es que son los únicos clones que presentan en sus hojas un peciolo de color verde con la base morada. Con relación a su variabilidad genética, estos clones poseen patrones de bandas de ADN muy similares, diferenciándose únicamente en 12 bandas, lo que quiere decir que poseen un bajo polimorfismo (5,45%).

Según el análisis estadístico, el clon D2 comparte un 91 y 85% de similitud con el clon D7 y clon D8, respectivamente. En las plantas del clon D2 también se evidenció la presencia de alas en el tallo maduro, hojas de color verde con tonalidades moradas, longitud de la punta de la hoja mayor a 5mm con un lobulado poco profundo, peciolo alado de color verde con bordes morados y superficie de los tubérculos poco rugosa y con algunas grietas. Sin embargo, entre las características que los diferencian se pueden mencionar: las hojas del clon D2 son alternas en la base y opuestas más arriba, poseen un peciolo de color verde con ambos extremos morados y la piel y pulpa de sus tubérculos presenta una coloración morada única entre los seis clones estudiados. Analizando los polimorfismos encontrados entre el clon D7, clon D8 y clon D2, se puede concluir que de las 207 bandas que comparten estos genotipos, 13 de ellas difieren con el patrón de bandas arrojado para el clon D2, lo cual quiere decir que existe un 6,28% de polimorfismo entre el clon D2 y su grupo más cercano.

El segundo subgrupo está conformado por el clon venezolano y el clon D13 con un índice de similitud de 0,825. Los tallos maduros de estas plantas presentan cera, sus hojas son opuestas, de color verde claro, lobulado poco profundo, pecíolos largos (de 6 a 9 cm) de color verde, sus tubérculos poseen pocas raicillas en su superficie y no posee grietas. Estos dos clones presentan un 10,9% de polimorfismo entre sí.

Por último, según el análisis de conglomerados el clon que más se aleja, con un índice de similitud de 0,40, es el clon colombiano. Aunque tiene pocas características morfológicas que lo diferencian del resto de los clones: el color de la nervadura de las hojas es amarillenta y la punta de la hoja es menor a 2 mm, a nivel genotípico este clon presenta un 47,94% de polimorfismo intraespecífico, con una marcada diferencia en el patrón de bandas expresado en comparación al obtenido para el resto de los clones estudiados.

Tabla 14. Índice de similitud basado en el coeficiente de Jaccard para seis genotipos de ñame considerando sus características morfológicas y moleculares.

	Clon D2	Clon D7	Clon D8	Clon D13	Clon colombiano	Clon venezolano
Clon D2	1					
Clon D7	0,910	1				
Clon D8	0,854	0,92	1			
Clon D13	0,771	0,816	0,882	1		
Clon colombiano	0,400	0,396	0,418	0,392	1	
Clon venezolano	0,787	0,833	0,854	0,825	0,427	1

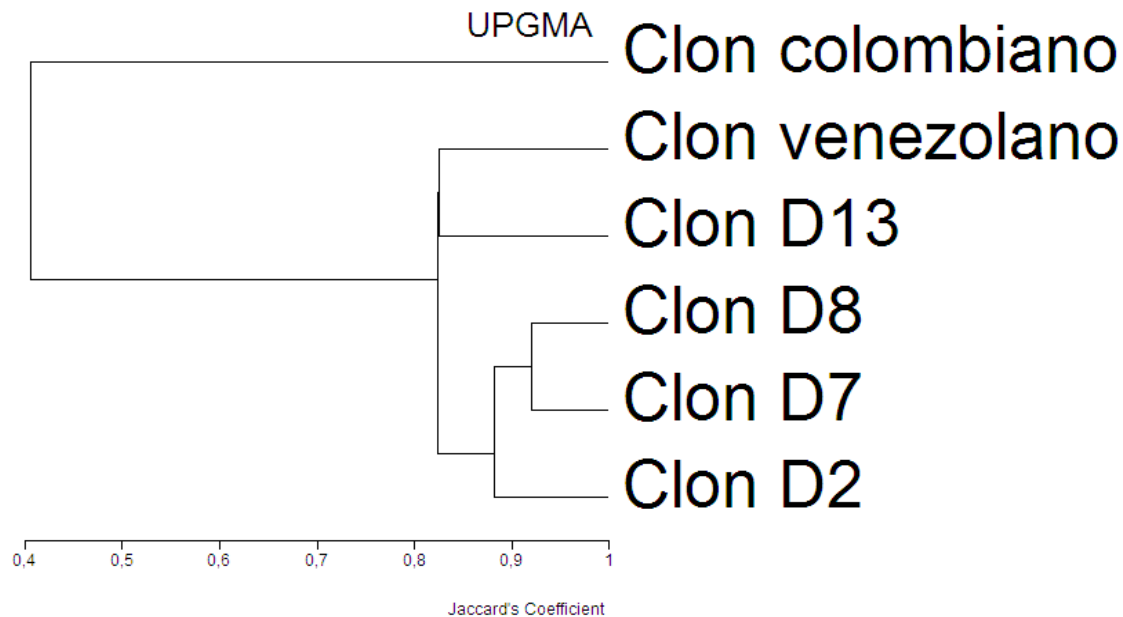


Figura 17. Dendrograma obtenido del análisis de conglomerados de la asociación de caracteres morfológicos y moleculares.

Para finalizar la discusión de estos resultados es interesante resaltar que la distribución de los clones en el dendrograma consenso es muy similar a la obtenida para la caracterización molecular pero se diferencia mucho de la caracterización morfológica. Esto puede deberse a que los caracteres morfológicos están influenciados por el ambiente lo cual provoca cambios a nivel fenotípico y puede llegar a alterar la caracterización, dando la apariencia de que hay más accesiones de las que en verdad existen en una colección de germoplasma.

Wilson y col. (1974, 1977) demostraron que las caracterizaciones generadas a través de descriptores morfológicos y marcadores moleculares suelen ser independientes, respondiendo en cada caso a reglas y presiones evolutivas diferentes. Por su parte Rivera y col. (2011) comenta que algunas de las más importantes variaciones morfológicas pueden ser el resultado de las diferencias en solo unos pocos genes. En este sentido, la similitud fenotípica no es necesariamente producto de la similitud genotípica, sino que se debe a que un diferente pool de genes pueden generar fenotipos similares.

Como se mencionó en la sección de materiales y métodos, los seis clones de ñame estudiados pertenecen a la especie *D. alata* y todos fueron colectados en el Estado Miranda, lo que en principio nos llevaba a pensar que la variabilidad entre ellos no sería tan elevada, sin embargo los resultados de la caracterización demuestran que existen diferencias muy marcadas, tanto a nivel morfológico y como a nivel molecular, que los definen como variedades completamente distintas con un polimorfismo de 71,23%. Las variaciones morfológicas más resaltantes, por ejemplo la forma de la hoja, el color del peciolo, la ausencia/presencia de alas en el tallo y el color de la pulpa de sus tubérculos, puede deberse a la presión ambiental o a la intensiva domesticación y a los procesos de selección que realizan los productores, favoreciendo la multiplicación de aquellas variedades que posean las características más atractivas para el comercio y dejando de lado aquellas que no tengan características promisorias. Al respecto González (2012) comenta que el ñame es un cultivo que posee una alta variabilidad genética debido a la continua domesticación de especies silvestres en muchos países del mundo, lo cual enriquece la diversidad de materiales que pueden ser utilizados para el mejoramiento de otros cultivos; sin embargo, este autor considera que la domesticación intensiva del ñame ha contribuido progresivamente con la degradación de los bosques y tierras fértiles, así como también con la pérdida de variedades locales.

Esta investigación es el primer aporte para el estudio de la diversidad morfológica y genética del cultivo de ñame en nuestro país. La caracterización morfológica de los seis clones de ñame resalta aquellos rasgos botánicos que permiten un mejor manejo y aprovechamiento de estos recursos fitogenéticos mientras que la caracterización molecular complementa el conocimiento que se tiene sobre los marcadores agromorfológicos usados para diferenciar las especies del género *Dioscorea* y permite contribuir con el mantenimiento del banco de germoplasma de ñame aportando elementos que enriquezcan los futuros programas de mejoramiento.

4. CONCLUSIONES

1. En la caracterización morfológica, el análisis de componentes principales reveló que los tres primeros componentes representan el 77,88% de la variabilidad. Entre las características con mayor poder discriminatorio podemos mencionar: ausencia/presencia de alas en el tallo, color de las alas en el tallo, ausencia/presencia de cera, posición de las hojas en el tallo, forma de la hoja madura, color de la nervadura de la hoja, color del peciolo de la hoja, color del ala del peciolo y color de la pulpa de los tubérculos.
2. El análisis de conglomerados y la elaboración del dendrograma de los datos obtenidos de la caracterización morfológica de los seis clones de ñame revelaron la formación de dos grupos, uno de ellos conformado a su vez por dos subgrupos. El primer subgrupo está conformado por el clon venezolano y el clon D7 separados a una distancia de 0,98. El segundo subgrupo está conformado por el clon D8 y el clon D2 separados a una distancia de 0,91 y el tercer grupo está conformado por el clon colombiano y el clon D13 separados a una distancia de 0,76.
3. La caracterización molecular de los seis clones de ñame mediante el uso de marcadores moleculares AFLP arrojó 219 fragmentos amplificados con un tamaño comprendido entre 250 a 8000 pb. Las 15 combinaciones de iniciadores empleadas amplificaron 63 bandas monomórficas y 156 polimórficas entre los seis clones de ñame, reflejando un alto porcentaje de polimorfismo intraespecífico de 71,23%. La combinación que posee el mayor poder discriminatorio es Ase 08-Taq 07, generando 15 bandas amplificadas con un 93,33% de polimorfismo entre los clones.
4. El clon colombiano presentó una variación en el patrón de bandas, registrando 105 bandas polimórficas con un 47,94 % de polimorfismo intraespecífico.
5. El genotipo de ‘arbolona negra’ resultó ser muy distinto al registrado para los clones de ñame. De las 219 bandas amplificadas 14 fueron monomórficas y 205 polimórficas, reportando un polimorfismo interespecífico de 93,60 %.
6. El dendrograma generado a partir del análisis de Cluster de los datos obtenidos de la caracterización molecular mostró claramente la formación de tres grupos. El primer grupo está conformado por el clon venezolano, clon D13, clon D8, clon D7 y clon D2 con un índice de similitud de 0,815. El segundo grupo está conformado por el clon

colombiano con un índice de similitud de 0,310 y tercer el grupo por ‘Arbolona negra’ con 0,264 de similitud.

7. El agrupamiento de los clones en el dendrograma obtenido de la caracterización morfológica no coincide con el registrado para la caracterización molecular, lo cual pueda deberse a que los caracteres morfológicos están influenciados por el ambiente lo cual provoca cambios a nivel fenotípico y puede llegar a alterar la caracterización.
8. El dendrograma consenso entre la caracterización morfológica y molecular arrojó la formación de dos grupos, uno de ellos conformado a su vez por dos subgrupos. El primer subgrupo con un índice de similitud de 0,91 está conformado por los clones D7 y D8, a estos se les une el clon D2 el cual comparte un 91 y 85% de similitud, respectivamente. El segundo subgrupo está conformado por el clon venezolano y el clon D13 con un índice de similitud de 0,825. Por último, el clon colombiano es el clon que más se aleja, con un índice de similitud de 0,40.

CAPÍTULO 3. Caracterización nutricional de los almidones de ñame (*Dioscorea alata* L.).

La industria alimentaria del sector del almidón y las harinas ha estado condicionada a unos cuantos cultivos tradicionales: maíz, papa, trigo, arroz y yuca. Las investigaciones actuales en el campo de los almidones se han enfocado en la búsqueda de fuentes amiláceas no convencionales con características nutricionales, fisicoquímicas, estructurales y funcionales diversas, que les proporcionen una amplia gama de potenciales usos industriales (Pérez y Pacheco, 2005).

El ñame es un alimento amiláceo poco convencional, muy importante tanto en el aspecto nutricional, como para el aprovechamiento a nivel industrial del almidón extraído de sus tubérculos. El contenido de almidón de los tubérculos de ñame supera al reportado para los tubérculos de papa (27,5 g contra 16,6 g, ambos datos reportados sobre 100 gramos de porción comestible) (Pacheco y Techeira, 2009).

Es por esto que en este capítulo se hace énfasis en los aspectos generales del almidón de ñame, su estructura química, cristalina y granular y la caracterización nutricional de los almidones de seis clones de ñame, estudiando su digestibilidad mediante la estimación del contenido de almidón potencialmente disponible y de almidón resistente total y evaluando por otra parte, la velocidad de digestión enzimática mediante la cinética de α -amilólisis.

1. ANTECEDENTES

1.1 Los almidones tropicales y su participación en el mercado mundial.

Las raíces y los tubérculos de plantas tropicales son alimentos básicos en la dieta de los pobladores de América Latina, África y Asia. Estas plantas están bien adaptadas a las condiciones agroclimáticas del sector en donde se desarrollan, lo que permite su crecimiento en abundancia con pocos insumos artificiales o ninguno; sin embargo, la cosecha de las raíces o tubérculos se realiza de manera artesanal principalmente por pequeños y medianos agricultores (FAO, 1991).

Los componentes principales de las raíces y tubérculos son los carbohidratos complejos en forma de almidón. El almidón constituye una parte importante en la dieta del hombre; es el segundo polisacárido más abundante después de la celulosa y es el primero en

importancia desde el punto de vista comercial al utilizarse ampliamente en la industria alimentaria y farmacéutica, entre otras (Meaño y col., 2014).

En los países tropicales en desarrollo, el éxito de las plantas feculentas como alimentos básicos está limitando su potencial contribución al desarrollo agrícola y al crecimiento económico general. Un estudio realizado por el Servicio de Agroindustrias y Gestión Postcosecha del Departamento de Agricultura de la FAO reveló que si bien se ha llevado a cabo una exhaustiva investigación de sus propiedades agronómicas y fenotípicas, los cultivos tropicales no se han beneficiado del tipo de investigación de valor agregado necesaria para que sean competitivos internacionalmente en la industria del almidón (FAO, 1991).

En consecuencia, el maíz, el trigo y la papa siguen dominando los lucrativos mercados mundiales de los almidones utilizados en las industrias de alimentos y no alimentarias (FAO, 1998). En Venezuela, los almidones empleados con mayor frecuencia provienen del maíz, papa, yuca y arroz, pero existen otras fuentes de almidón poco convencionales cuyo potencial puede ser explotado, buscando alternativas que aumenten el valor agregado de los rubros agrícolas locales, tal es el caso de los tubérculos y bulbillos de *Dioscorea* (Meaño y col., 2014).

Hasta hace poco tiempo, los mercados mundiales de los almidones estaban prácticamente cerrados a las importaciones. Los derechos eran tan elevados que era casi imposible vender otra cosa diferente a los productos ya establecidos y a precios dictados por los compradores. Se consideraba absurda toda idea de añadir valor a los almidones extraídos de fuentes no convencionales; sin embargo, esto ha comenzado a cambiar debido a estudios recientes sobre las propiedades químicas de cada almidón, en donde puede estar la clave del éxito de estos productos poco convencionales (Acuña, 2012).

Urge dirigir la investigación agrícola a los países tropicales donde no se ha establecido una tradición sólida de investigación de valor agregado que permita estudiar las características de los productos que facilitan el proceso de transformación y lo vuelven más eficiente. Con ligeros cambios en la proporción entre amilosa y amilopectina se pueden conseguir enormes efectos en una amplia variedad de características funcionales útiles que

requiere el consumidor final y que está dispuesto a pagar. Sin esta nueva orientación de la investigación, en el ámbito nacional e internacional, es poco probable que los almidones con valor agregado producidos en los países en desarrollo lleguen a tener una presencia significativa en los mercados mundiales (Acuña, 2012).

1.2 Usos de los almidones

La diversidad de las propiedades funcionales de los almidones necesarias para la industria alimentaria es casi ilimitada. Por ejemplo, ningún otro ingrediente proporciona textura a tanta variedad de alimentos como el almidón. Ya sea que se trate de sopas, cocidos, salsas, relleno para tartas o flanes, el almidón proporciona un producto consistente y estable durante el almacenamiento (Pacheco y Techeira, 2009).

Los almidones son muy importantes en la industria alimentaria debido a que son neutros, no son dulces y no se disuelven fácilmente en agua fría. Además, cuando se calienta una suspensión de gránulos de almidón en agua, éstos se hinchan o se gelatinizan, agregando viscosidad a la suspensión y formando una pasta que al enfriarse se usa como un gel para recubrir postres (Potter, 1982).

El almidón también tiene una gran variedad de aplicaciones en las industrias no alimentarias y cada aplicación exige características muy particulares. Incluso en las aplicaciones no alimentarias más básicas del almidón, se utiliza mucho valor agregado: los almidones adhesivos se tratan con ácidos o con alcaloides y se modifican con oxidantes, sales y alcoholes. Los almidones textiles se esterilizan, se oxidan y se someten a diversos agentes de interconexión cruzada (Vargas y Hernández, 2012).

La utilización de almidones complejos destaca en los productos de papel. Los almidones sirven para dar mayor fuerza a los pañuelos y toallas de papel y permiten aprovechar más el papel reciclado en cartón. El almidón también se utiliza en las películas y hojas de plástico, así como en las fórmulas de fibras naturales que irán reemplazando a las espumas de plástico. Esto contribuye con las continuas exigencias de que los productos utilizados para la fabricación de plástico a nivel industrial sean biodegradables (Vargas y Hernández, 2012).

Potter (1982) cita una amplia variedad de productos no alimentarios en donde se utiliza el almidón:

- Adhesivos: gomas de cola de fusión, estampillas, encuadernación, sobres, etiquetas.
- Explosivos: adhesivo para la cabeza de los fósforos
- Papel: recubrimiento de papel, pañales desechables.
- Construcción: aglutinante para tabiques de concreto, adhesivo para madera laminada.
- Metal: adhesivo de metal poroso, aglutinante para núcleos de fundición.
- Textiles: acabado de telas, estampado.
- Cosméticos: maquillajes, cremas faciales.
- Farmacéuticos: revestimiento de cápsulas, agentes dispersantes.
- Minería: separación de minerales por flotación y sedimentación.
- Otros: películas de plásticos biodegradables, baterías secas.

1.3 Aspectos generales del almidón

1.3.1 Definición y estructura química

El almidón es un carbohidrato de reserva presente en grandes cantidades en raíces, tubérculos, cereales, semillas y leguminosas, bajo la forma de gránulos parcialmente cristalinos, cuya forma y tamaño varía según el origen botánico (Baudi, 2006). En los cereales se encuentra principalmente en productos como el maíz, el trigo y el arroz, a concentraciones que oscilan entre 30 a 80%; en las semillas de algunos frijoles o habas se encuentra entre 25 a 50%, y en las raíces y tubérculos, tales como yuca, papa, batata y ñame, el almidón representa entre un 60 a 90% del peso seco (Srichuwong y col., 2005).

El almidón es un homopolisacárido de moléculas de anhidro D-glucosa las cuales se encuentran unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos α (1-4) y α (1-6) formando dos tipos de polímeros: amilosa y amilopectina. La variación en el contenido de amilosa y amilopectina está determinada por la fuente botánica. La proporción bajo la cual se encuentran, modifica las propiedades físico-químicas y funcionales de los gránulos de almidón y en consecuencia su utilización en alimentos y aplicaciones industriales (Wurzburg, 1986).

La amilosa es un polímero esencialmente lineal constituido por moléculas de glucosa, las cuales se encuentran unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos de tipo α -D-(1-4), formando unidades estructurales de maltosa (**Figura 18**); el número de unidades varía entre los diferentes tipos de almidones, pero generalmente se encuentran entre 500 a 2000 unidades de glucosa por molécula de amilosa (Buleón y col., 1998).

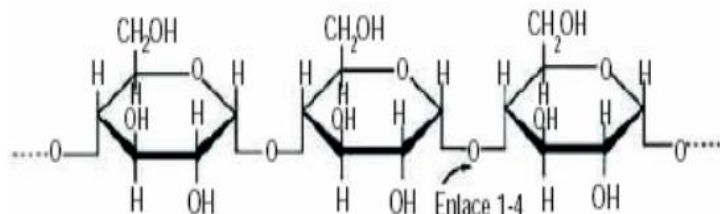


Figura 18. Estructura química del polímero de amilosa (Tomado de Buleón y col., 1998)

En un extremo, la unidad de glucosa contiene el hidroxilo del carbono anomérico libre, por lo cual se llama extremo reductor. En el extremo opuesto o no reductor, el hidroxilo del carbono anomérico forma parte del enlace glucosídico. La abundancia de hidroxilos otorga propiedades hidrofílicas al polímero; impartándole afinidad por el agua. Sin embargo, debido a su linealidad, los polímeros de la amilosa tienden a agruparse en forma paralela mediante la formación de puentes de hidrógeno con los hidroxilos de polímeros adyacentes, reduciendo así su afinidad por el agua (Englyst y Hudson, 2000).

La presencia de los enlaces α -D-(1-4) determina que los anillos de glucosa no se encuentren en la misma zona planar, por lo tanto la molécula de amilosa no es una estructura plana sino que cada unidad de glucosa forma un ángulo con la molécula de glucosa anterior, adoptando una disposición espacial helicoidal estabilizada por puentes de hidrógeno los cuales pueden debilitarse o romperse fácilmente por la acción del pH y la temperatura. Debido a su carácter esencialmente lineal y a la presencia de enlaces α -D-(1-4), la amilosa es susceptible a formar complejos con moléculas hidrofóbicas como el yodo, los ácidos grasos y los hidrocarburos (Roger y Colonna, 1992).

En los almidones de raíces y tubérculos existen variaciones en el contenido de amilosa: se han reportado valores de 22% para el almidón de papa y de 18% en almidón de yuca;

mientras que para el almidón de batata se han obtenido valores que van desde 18% hasta 20% (Zobel, 1988; Srichuwong y col., 2005). El contenido de amilosa en el almidón de ñame presenta variaciones leves de una especie a otra. En promedio, el contenido de amilosa para *Dioscorea alata* es de 28,50%, según Karam y col. (2006), porcentaje muy cercano al reportado por Araujo y col. (2004) para *Dioscorea bulbifera*, quienes mencionan en su estudio un porcentaje de 29,37% de amilosa y un porcentaje de 70,26% de amilopectina.

La amilopectina es un polímero ramificado formado por unidades de anhidro D-glucosa, unidas mediante enlaces α (1-4) en las zonas lineales y enlaces α (1-6) en los puntos de ramificación (**Figura 19**). Este polímero adopta la forma de una especie de ovillo reticulado en el que cada 20 a 30 anillos de glucosa aparece una ramificación. Presenta un 5 a 6% de enlaces α (1-6) y está constituida por aproximadamente 100.000 moléculas de glucosa (Cubero, 1984). La amilopectina está integrada por tres tipos de cadenas: una larga cadena central “C” que se ramifica en múltiples cadenas “B” con longitudes de 23–25 residuos de glucosa. Estas últimas dan lugar a otras cadenas “B” o a racimos de numerosas cadenas cortas “A” de 13–23 residuos de glucosa (Buleón y col., 1998).

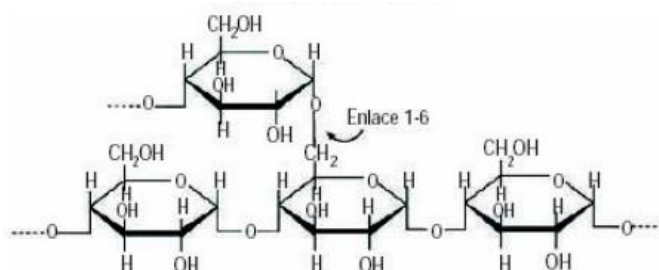


Figura 19. Estructura química del polímero de amilopectina (Tomado de Buleón y col., 1998)

La fracción de amilopectina se presenta bajo la forma de racimo debido a que sus cadenas ramificadas continúan ramificándose hasta formar una estructura definida alrededor de una cadena central, que es la única que presenta un extremo reductor (Cummings y Englyst, 1995). El gran tamaño y naturaleza ramificada de la amilopectina reduce su movilidad e interfiere en su tendencia a orientarse, disminuyendo la posibilidad de formación de puentes de hidrógeno entre cadenas del polímero (Cubero, 1984).

Por lo tanto, las soluciones acuosas de amilopectina se caracterizan por su claridad, estabilidad y resistencia a la formación de geles durante el almacenamiento; es decir, es menos susceptible al proceso de retrogradación. No obstante, en condiciones de temperatura elevada y a altas concentraciones, la fracción ramificada de amilopectina puede retrogradar (Ishiguro, 2000).

Según Freitas y col. (2004) los almidones de ñame y de yuca presentan moléculas de amilopectina de cadenas muy cortas, con grados de polimerización (DP) que van desde los 6 hasta los 12 DP. La proporción en la cual se encuentran estas cadenas es de 19 y 17%, respectivamente; mientras que en el resto de los almidones de raíces y tubérculos, estas cadenas extremadamente cortas se encuentran en apenas un 13% de la estructura de la molécula de amilopectina. Liendo y col. (2011) realizaron la extracción de almidón de apio (*Arracacia xanthorrhiza* Bancr.) para caracterizarlo de acuerdo a su composición química, propiedades físicas y reológicas, y utilizarlo como agente espesante en colados de durazno (*Prunus persica* L.). Los resultados obtenidos indican que el almidón extraído tuvo un bajo rendimiento (6,12%) pero alto grado de pureza (94,9% de almidón), con un contenido de amilosa de 22,9%. Además, presentó una alta capacidad de absorción de agua, poder de hinchamiento y solubilidad, baja temperatura de gelatinización y alta viscosidad en calentamiento.

Zaidul y col. (2007) determinaron la composición química de almidones de papa, batata, yuca y ñame. En la **Tabla 15** se puede apreciar que al analizar el almidón de cada uno de estos rubros, no se observaron diferencias significativas para la concentración de grasa y proteínas; no obstante, el contenido de amilosa fue significativamente superior para los almidones de yuca y ñame, con valores iguales a 28,8 y 25,8%, respectivamente.

Tabla 15. Composición química de los almidones de papa, batata, yuca y ñame (Zaidul y col., 2007).

Muestra	Humedad (%)	Proteína (%)	Grasa (%)	Amilosa (%)	Fósforo (ppm)
Papa	15,6	<0,1	Trazas	21,5 ± 1,1 ^d	847,2 ^a
Batata	15,9	<0,1	Trazas	23,4 ± 1,0 ^c	231,3 ^b
Yuca	13,4	<0,1	Trazas	28,8 ± 0,7 ^a	97,0 ^d
Ñame	16,9	<0,1	Trazas	25,8 ± 0,5 ^b	166,1 ^c

Valores seguidos de letras diferentes en la misma columna muestran diferencias estadísticamente significativas a $p < 0,05$

Por su parte, Jayakody y col. (2007) al analizar la composición química de los almidones de ñame, específicamente de las especies *D. esculenta* y *D. alata*, determinaron que éstas presentaban un alto grado de pureza debido a su bajo contenido de cenizas y proteínas. El contenido de amilosa total fue de 23,97% para *D. esculenta* y 29,29% para *D. alata*, valores similares a los obtenidos por Hoover (2001) para almidones de *Dioscorea* y de otros tubérculos (de 10 a 38%).

1.3.2 Estructura cristalina y granular del almidón

El almidón está organizado en pequeñas partículas conocidas como gránulos, cuya morfología y composición química son características de cada especie. La variación del tamaño en los gránulos de almidón va de 0,5 a 150 μm . El tamaño de los gránulos es una de las características que más afecta las propiedades funcionales del almidón. Se ha reportado que los gránulos pequeños tienen una mayor solubilidad en agua y una alta capacidad de absorción de agua. Los gránulos de almidón cuando se extraen y se secan tienen la apariencia de un polvo blanco y son insolubles en agua fría (Vizcarrondo y col., 2004).

En forma general, los gránulos de almidón presentan una composición química con 0,06–0,45% de proteína, 0,05–0,8% de lípidos y 0,08–0,5% de cenizas y el resto lo forma el almidón propiamente dicho. Los gránulos pueden reconocerse por su forma, tamaño y temperatura de gelatinización. Los gránulos de los tubérculos son generalmente grandes y elipsoidales. En los cereales, son esféricos, hemisféricos o poliédricos y en las leguminosas son arriñonados u ovoides (Vizcarrondo y col., 2004).

El gránulo de almidón tiene una estructura semicristalina compleja y altamente ordenada. La organización intramolecular entre amilosa y amilopectina mediante puentes

de hidrógeno entre grupos hidroxilo o directamente a través de moléculas de agua, conduce a la formación de una estructura semicristalina altamente organizada, donde alternan las zonas cristalinas (dobles hélices) con las amorfas (zonas de densa ramificación) (Cummings y Englyst, 1995).

Entre los factores que afectan la susceptibilidad enzimática del almidón se encuentran: el nivel molecular, la estructura cristalina, el empaquetamiento de la región amorfa y la cantidad de los enlaces α (1-6) que dificultan la α -amilólisis. Inicialmente se propuso que la digestión del almidón iniciaba en la región amorfa y que la región cristalina no podía ser digerida a menos que se encontrara desorganizada (Vizcarrondo y col., 2004). Recientemente, Zhang y col. (2006) revelaron que la digestión incluía tanto las regiones amorfas como las cristalinas y que este proceso ocurría de lado a lado (en la superficie del gránulo) y de adentro hacia afuera (cuando los gránulos tienen poros). A pesar de que las regiones amorfas son más susceptibles a la hidrólisis, éstas se encuentran estrechamente vinculadas a las zonas cristalinas durante toda la digestión, lo que ocasiona que la hidrólisis ocurra simultáneamente.

Los gránulos de almidón muestran un grado de cristalinidad de 15 a 45% que se atribuye al entrelazamiento y a la formación de doble-hélice entre las cadenas externas de amilopectina. La existencia de un orden cristalino en el gránulo de almidón se evidencia mediante la técnica de cristalografía de rayos X. De esta manera han sido identificadas tres tipos de estructuras cristalinas con base en el patrón de difracción: tipo A, tipo B y tipo C (Figura 20). La relación entre estas estructuras es el principal factor que determina las propiedades del almidón (Imberty y col., 1991; Sajilata y col., 2006).

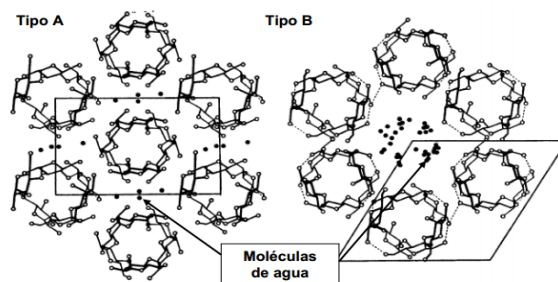


Figura 20. Arreglo de las doble hélices de los cristales tipo A y B en los gránulos de almidón. Adaptado de Buleón y col., 1998

Hizukuri (1985) determinó las longitudes promedio de las cadenas de amilopectina en una amplia variedad de almidones y su relación con el patrón de difracción. Comprobó que la estructura tipo A presenta longitudes promedio entre 23–29 residuos de glucosa, la estructura tipo B entre 30–44 y la estructura tipo C entre 26–29.

Desde el punto de vista nutricional, los almidones con patrones tipo B tienden a presentar mayor resistencia a la hidrólisis enzimática que aquellos que presentan un patrón de difracción tipo A, mientras que los almidones con patrones tipo C presentan un grado de hidrólisis intermedio entre éstos (Gallant y col., 1992). Por lo general, el almidón de los cereales suele exhibir el patrón A, mientras que el almidón de los tubérculos, el de las raíces y el de aquellos ricos en amilosa, exhiben el patrón B. El patrón C se ha reportado en el almidón de algunos tubérculos y en las semillas de las leguminosas. Cabe destacar que las condiciones de temperatura e hidratación durante el crecimiento de la planta, pueden incluir cambios importantes en la estructura cristalina del almidón. La estructura tipo A es obtenida preferentemente en las condiciones de baja humedad y alta temperatura, mientras que la estructura tipo B se suele obtener en las condiciones opuestas (Colonna y col., 1992).

Los almidones de ñame, así como los almidones de otras raíces y tubérculos, difieren en forma y tamaño según la especie; el conocimiento de estas diferencias permite determinar su capacidad de absorción de agua y la susceptibilidad del gránulo frente a la acción de ciertos agentes físicos, químicos y enzimáticos. Además, la forma del gránulo se utiliza como indicador del origen del almidón y puede ser utilizado como parámetro de calidad para identificar almidones de ñame adulterados (Niba y col., 2001).

La morfología de los gránulos de almidón de diferentes especies de ñame, yuca y papa, fue determinada por Farhat y col. (1999), haciendo uso de microscopía de luz polarizada. Los resultados obtenidos determinaron la existencia de diferencias significativas en cuanto a la forma y tamaño de los diversos almidones en estudio, siendo los gránulos de tres especies de ñame (*D. cayenensis*, *D. rotundata* y *D. alata*) y los gránulos de papa, los de mayor tamaño; mientras que los gránulos de almidón de yuca y de *D. dumetorum* eran más pequeños que los anteriores.

Según Jayakody y col. (2007) los almidones extraídos a partir de diferentes especies de *Dioscorea* pueden exhibir patrones de difracción del tipo A en *D. dumetorum* y del tipo B en *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. esculenta*.

En el trabajo de Vizcarrondo y col. (2004) se muestran las fotomicrografías de los gránulos de almidón nativo de *D. bulbifera* obtenidas por microscopía electrónica de barrido. Los gránulos de almidón se observan mayormente de forma irregular, similares a una pirámide con vértices redondeados. Los valores promedio y la desviación estándar para el diámetro mínimo y máximo de los gránulos de almidón de *D. bulbifera* son de $21,83 \pm 6,38 \mu\text{m}$ y $35,00 \pm 8,70 \mu\text{m}$ respectivamente ($n = 15$) (**Figura 21**). El rango de valores encontrados para el almidón de *D. bulbifera* indica que los gránulos son grandes, similar a lo reportado para *D. alata* (20–140 μm) y *D. cayenensis* (10–70 μm), y de mayor tamaño al compararlos con lo observado para gránulos de almidón de *D. esculenta* (1–5 μm). Las micrografías muestran que para *D. bulbifera* los gránulos son de superficie lisa, sin fracturas ni roturas, lo que indica un procedimiento de aislamiento y purificación adecuado.

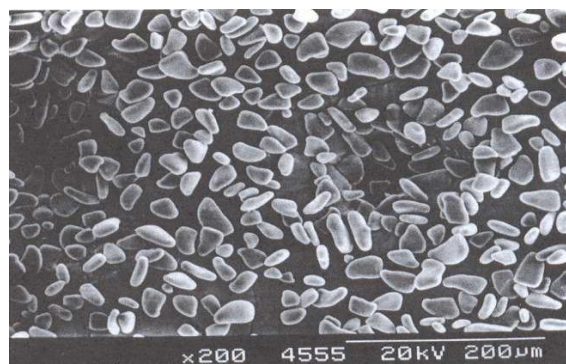


Figura 21. Fotomicrografías de gránulos de almidón nativo de *Dioscorea bulbifera*. (Tomado de Vizcarrondo y col., 2004).

1.3.3 Aspectos nutricionales del almidón

1.3.3.1 El proceso de digestión

La digestión de los gránulos de almidón es un proceso complejo que depende de diferentes fases: la difusión de la enzima hacia el sustrato, la presencia de poros y/o canales en el gránulo, la adsorción de la enzima al material amiláceo y el evento hidrolítico. La difusión de la α -amilasa al sustrato es considerada una etapa importante de la hidrólisis del almidón. La formación de una malla con los componentes del alimento como lípidos y

proteínas y la posible interacción del almidón con alguno de ellos puede prevenir la difusión y absorción de la enzima. El tamaño de la partícula tiene un papel importante en la hidrólisis, ya que una partícula pequeña muestra una alta susceptibilidad enzimática, mientras que una partícula grande presenta un área superficial mayor, lo que se ve reflejado en la resistencia de los gránulos a la digestión enzimática (Colonna y col., 1992).

El primer paso en la digestión de los carbohidratos es la masticación de los alimentos. Durante esta fase los gránulos de almidón se rompen y se reduce el tamaño de sus partículas (Szepesi, 1991), aumentando la superficie de exposición a las enzimas amilolíticas. La α -amilasa salival cataliza la hidrólisis de los enlaces α (1,4) de las cadenas de amilosa y amilopectina. Sin embargo, el pH óptimo de esta enzima es de 6,7 y su acción es eventualmente inhibida por el jugo gástrico ácido luego del ingreso del bolo alimenticio al estómago (Ganong, 2003). De esta manera, la hidrólisis se retrasa o se detiene en el estómago y vuelve a iniciarse en el duodeno (región proximal del intestino delgado), a donde llega la α -amilasa secretada por el páncreas (α -amilasa pancreática) (Szepesi, 1991). Ambas α -amilasas hidrolizan las uniones α (1,4) adyacentes a los puntos de ramificación (Ganong, 2003). En consecuencia, la acción acumulativa de ambas α -amilasas son oligosacáridos: el disacárido maltosa, el trisacárido maltotriosa y algunos polímeros de glucosa ligeramente más grandes con uniones α (1,4); así como α -dextrinas o dextrinas límite, que son polímeros de glucosa con enlaces α (1,4) (entre 3–5 unidades) con una unidad de glucosa con uniones α (1,6) (Ganong, 2003).

Las enzimas que completan la hidrólisis de los productos de la digestión del almidón y los principales disacáridos de la dieta (sacarosa y lactosa) se encuentran en el borde en cepillo de las membranas celulares de los enterocitos o células de la mucosa intestinal. La acción catalítica de las disacaridasas y oligosacaridasas produce glucosa libre que es transportada activamente al interior de los enterocitos y desde allí al sistema circulatorio (Tovar, 1992; 1994).

La velocidad a la cual el almidón y los azúcares son digeridos y absorbidos durante el tránsito en el intestino delgado, ha recibido considerable interés debido a la asociación con la respuesta glucémica y el metabolismo postprandial del sustrato. Los alimentos que

contienen azúcares libres, almidón gelatinizado y que presentan una fácil dispersión de la matriz del alimento, son digeridos y absorbidos más rápidamente. Sin embargo, aquellos que restringen el acceso de las enzimas digestivas al almidón y liberan a los carbohidratos lentamente de la matriz del alimento, prolongan el proceso de digestión (Englyst y Englyst, 2005).

1.3.3.2 Digestibilidad del almidón

El almidón es uno de los principales carbohidratos en la dieta y contribuye con el 60-70% de los carbohidratos disponibles o glucémicos. Los carbohidratos glucémicos se definen como la fracción del almidón digerida por las enzimas digestivas humanas en el tracto gastrointestinal y absorbida como glucosa en el torrente sanguíneo (Slaughter y col., 2001).

La digestibilidad es la principal característica nutricional de los alimentos amiláceos, un parámetro cuantitativo que puede ser estudiado tanto *in vitro* como *in vivo*. La estimación de los contenidos de almidón disponible y de almidón resistente total ha permitido indagar acerca de la biodisponibilidad de los almidones, mientras que la cinética de α -amilólisis ha proporcionado información sobre las velocidades de digestión enzimática.

En las investigaciones emprendidas por Moorthy (2002), García (2003), Galeno (2006), Marín (2009), Martín (2010), González-Quilen (2013) y Lovera (2014), se ha evaluado la digestibilidad *in vitro*, mediante análisis químicos y enzimáticos de los almidones nativos y modificados de diversas fuentes botánicas, tales como el maíz, el banano, la yuca, la papa, el apio, el ñame, entre otras. En todos estos estudios se encontró una gran variabilidad en la biodisponibilidad y la susceptibilidad de los almidones nativos a la hidrólisis, lo cual evidencia la gran diversidad existente en la composición química y en la estructura de los gránulos según el origen botánico. Por ejemplo, Moorthy (2002) reportó buena digestibilidad para la yuca y la batata pero baja para el ñame.

1.3.3.3 Factores que afectan la digestibilidad del almidón

Según Englyst y col. (1992) la biodisponibilidad del almidón, es decir, la proporción del nutriente que es digestiva y metabólicamente disponible, y la velocidad con la cual ocurre la digestión y la absorción, dependen de múltiples factores inherentes o no al almidón:

- a) La macroestructura y propiedades de los alimentos amiláceos (por ejemplo, la estructura del tejido de la planta que contiene los gránulos de almidón).
- b) La estructura y propiedades fisicoquímicas de los gránulos (tamaño del gránulo, relación amilosa-amilopectina, grado y tipo de cristalinidad, longitud de las cadenas de amilopectina, grado de asociación molecular entre los componentes del almidón), las cuales varían dependiendo del origen botánico.
- c) La presencia de otros componentes dietarios como la fibra y lípidos, así como antinutrientes (proteínas inhibidoras de la α -amilasa).
- d) Las condiciones de procesamiento, por ejemplo los tratamientos hidrotérmicos en donde el almidón es gelatinizado (Englyst y Englyst, 2005).

Los factores intrínsecos (las propiedades del alimento amiláceo) pueden ser medidos de forma reproducible pero no son necesariamente buenos predictores de la biodisponibilidad y de la tasa de hidrólisis del almidón entre diferentes individuos. Esto se debe a que la ingesta expone los alimentos a factores extrínsecos que pueden también retardar o acelerar la digestión: el grado de masticación, la concentración de la enzima α -amilasa en el intestino delgado y el tiempo de tránsito del alimento entre la cavidad bucal y el íleon terminal (Colonna y col., 1992).

El procesamiento de los alimentos induce cambios físicos en el almidón que pueden modificar dramáticamente su susceptibilidad a la hidrólisis. Cuando el alimento amiláceo es sometido a la cocción (usualmente entre 50–70 °C) en exceso de agua (> 300% de humedad), la estructura granular sufre un cambio irreversible denominado gelatinización. El gránulo experimenta un proceso de hinchamiento que supone la pérdida del orden interno y de la cristalinidad. A escala molecular, los puentes de hidrógeno que estabilizan las estructuras cristalinas sufren una ruptura, generándose gránulos porosos con un esqueleto de amilopectina disperso en una solución amorfa de amilosa. El almidón gelatinizado es mucho más accesible a las α -amilasas que el almidón crudo, por lo cual es hidrolizado de forma más rápida y extensa (Colonna y col., 1992).

El almidón gelatinizado es una estructura inestable, con el enfriamiento y el almacenamiento del alimento amiláceo ocurre la reasociación de las cadenas de amilosa y

de amilopectina y la subsecuente recuperación de la propiedad semicristalina del almidón (retrogradación). La retrogradación de la amilosa es veloz, tomando solo unas pocas horas, mientras que la reasociación de las cadenas externas de la amilopectina puede demorar varios días. Este proceso se acelera a bajas temperaturas, a altas concentraciones de almidón y en almidones con largas cadenas de amilosa y de amilopectina. El almidón retrogradado adopta un patrón cristalino de tipo B (Colonna y col., 1992). La temperatura de gelatinización es una característica específica de cada almidón en particular y depende de diversos factores, tales como el tamaño de los gránulos, la relación amilosa/amilopectina y las fuerzas intra e intermoleculares, entre otras. La temperatura de gelatinización es un índice de ordenamiento intragranular y entre mayor sea este valor, mayor será el grado de asociación de las moléculas en el interior del gránulo de almidón (Rached y col., 2006).

Con relación al almidón de ñame, Jayakody y col. (2007) reportaron que la temperatura de gelatinización para dos variedades de *D. alata*, “Hingurala” y “Raja-ala”, resultó ser de 85 y 78% respectivamente. Por otra parte, Riley y col. (2006) realizaron la caracterización fisicoquímica de almidones de ñame jamaquino, reportando que la temperatura de gelatinización estuvo en un rango comprendido entre 74 a 75 °C. Queda en evidencia que la temperatura de gelatinización varía de acuerdo a las distintas variedades o especies de ñame y que esta variación puede darse por la influencia de factores agroclimáticos y fertilización sobre el crecimiento de los tubérculos, tal y como lo menciona Pérez y col. (2013).

Durante el hervido, los tubérculos experimentan cambios en la composición proximal de sus nutrientes. Ezeocha y Ojimelukwe (2012) encontraron que el contenido de proteína cruda (10,27%), ceniza (2,93%) y lípidos (0,15%) disminuyó significativamente en los tubérculos hervidos, mientras que el contenido de carbohidratos (76,57%) aumentó significativamente. Los antinutrientes como alcaloides (2,77%), saponinas (2,71%), flavonoides (1,38%) y taninos (0,21%) se redujeron significativamente en los tubérculos hervidos. Estos autores concluyeron que la ebullición tuvo efectos positivos y negativos en el ñame, por lo que recomendaron un tiempo de cocción entre 30 y 60 min a 100 ° C para *D. alata*.

1.3.3.4 Clasificación nutricional del almidón

La calidad nutricional del almidón depende en gran medida de la transformación y el estado del almidón. Como se mencionó anteriormente, se pensaba que prácticamente todo el almidón era hidrolizado y absorbido en el intestino delgado. Hoy en día se ha comprobado la existencia de diferentes tipos de almidón, que están clasificados en función de su velocidad de hidrólisis y absorción en el intestino delgado.

Englyst y col. (1992) propusieron una clasificación del almidón en: almidón de digestión rápida (ADR), almidón de digestión lenta (ADL) y almidón resistente (AR) (**Tabla 16**). Las fracciones rápida y lentamente digeribles del almidón son estimadas mediante la cuantificación *in vitro* de los azúcares liberados de la hidrólisis enzimática controlada del alimento amiláceo. Según el método descrito por Englyst y col. (1992), el almidón rápidamente digerible es hidrolizado completamente entre los 0–20 minutos, mientras que la hidrólisis de la fracción lentamente digerible ocurre entre los 20–120 minutos. Por otra parte, el AR es la cantidad de almidón que no es hidrolizado después de los 120 minutos de la hidrólisis.

Tabla 16. Clasificación nutricional del almidón

Tipo de almidón	Susceptibilidad a la digestión	Alimentos que lo contienen
Digestión rápida	Rápida y complemente digerido y absorbido en el intestino delgado	Alimentos amiláceos sometidos a cocción.
Digestión lenta	Completamente digerido en el intestino delgado, pero de manera significativamente más lenta	Cereales y otros alimentos amiláceos crudos; pastas.
Resistente	No digerible	
Tipo 1: almidón físicamente inaccesible		Granos y semillas parcialmente molidas; pasta.
Tipo 2: gránulos resistentes		Alimentos amiláceos crudos y almidones ricos en amilosa.
Tipo 3: almidón retrogradado		Alimentos amiláceos (papa, legumbres y arroz) enfriados previa cocción, pan envejecido.

Tabla 16. Clasificación nutricional del almidón. Continuación

Tipo 4: almidón con enlaces no amiláceos	Almidones modificados mediante tratamientos químicos y algunos tratamientos físicos drásticos.
Tipo 5: complejo amilosa-lípido	Comúnmente encontrado en gránulos de almidón nativo y almidones procesados

Adaptado de Englyst y col. (1992), Laurentin y Edwards (2013) y Nonhlanhla y col. 2016

El término almidón resistente describe la fracción de almidón que es resistente a la hidrólisis exhaustiva de las α -amilasas. Las razones de la resistencia a la degradación son numerosas y causadas en gran parte por las características estructurales del almidón (cristalinidad, estructura granular y forma física del alimento). Actualmente, el término almidón resistente es definido como la suma del almidón y sus productos de degradación que no son hidrolizados ni absorbidos en el intestino delgado de individuos sanos y es fermentado en el colon por la microbiota (Brouns y col., 2002).

El almidón resistente está subdividido en cinco diferentes tipos. El almidón resistente tipo 1 agrupa a los almidones físicamente inaccesibles a la acción de las α -amilasas debido a la presencia de estructuras externas que protegen al gránulo, por ejemplo la pared de la célula vegetal. Se encuentra principalmente en las semillas, los granos, los cereales y las legumbres, enteros o parcialmente molidos, aunque también puede hallarse en algunos alimentos amiláceos densamente empaquetados como la pasta. A pesar de que es estable al ser sometido a la cocción, el almidón resistente de tipo 1 puede ser eliminado parcial o totalmente por la ruptura mecánica de la molienda, e incluso con la masticación de los alimentos (Muir y col., 1994; Sajilata y col., 2006; Laurentin y Edwards, 2013).

El almidón resistente tipo 2 incluye los almidones no susceptibles a la digestión debido a la combinación de algunas propiedades intrínsecas del gránulo como la forma, el tamaño, la cristalinidad y un alto contenido de amilosa. El almidón resistente tipo 2 está presente en los alimentos amiláceos crudos tales como la papa, el banano y en los almidones ricos en amilosa como el amilo-maíz. La mayor parte de esta fracción de almidón resistente es eliminada con la cocción de los alimentos (Brouns y col., 2002).

El almidón resistente tipo 3 representa la fracción más frecuente de almidón resistente, está presente en la mayoría de los alimentos que han sido sometidos a un proceso de cocción, enfriados y posteriormente almacenados por varias horas. Corresponde al almidón retrogradado, que se ha reorganizado después de la gelatinización. Este tipo de almidón es producto de los cambios que han ocurrido en las moléculas de amilosa y de amilopectina (Brouns y col., 2002).

El almidón resistente tipo 4 incluye tanto los almidones modificados químicamente como aquellos modificados mediante tratamientos físicos drásticos. Es conocido que los alimentos modificados en la industria mediante los tratamientos químicos como el entrecruzamiento (generación de rearrreglos moleculares), la adición de grupos químicos en polímeros y tratamientos físicos drásticos como la pregelatinización (por extrusión o por secado en tambor) y la pirodextrinización (generación de rearrreglos moleculares mediante calor seco) generan fracciones resistentes a la hidrólisis enzimática. Tales tratamientos afectan la temperatura crítica de gelatinización, la estabilidad al congelamiento, la solubilidad en agua fría o la viscosidad; confiriéndole al almidón ciertas características funcionales que son útiles en el procesamiento de los alimentos, pues le otorga además la capacidad de resistir condiciones que afectarían la integridad de la forma nativa (Herrera, 1997).

Se sabe que la amilosa forma complejos simples helicoidales con muchas otras sustancias incluyendo el iodo, monoglicéridos, lisofosfolípidos, ácidos grasos y alcoholes. El complejo amilosa-lípido, comúnmente encontrado en gránulos de almidón nativo y almidones procesados, ha sido propuesto como almidón resistente tipo 5 a causa de su resistencia a la hidrólisis enzimática mediante la restricción del hinchamiento del gránulo durante el calentamiento (Becker y col. 2001). La resistencia enzimática del complejo amilosa-lípido depende de la estructura molecular del lípido y de la estructura cristalina de las hélices de amilosa. Un ácido graso con una mayor longitud de cadena hidrocarbonada produce un complejo amilosa-lípido con mayor resistencia enzimática, mientras que un ácido graso con un mayor grado de insaturación produce complejos amilosa-lípido con una baja resistencia enzimática. Además, una forma cristalina del complejo amilosa-lípido tiene mayor resistencia enzimática que su contraparte amorfa (Biliaderis y Galloway, 1989).

1.3.4 Efectos fisiológicos e importancia en la salud del almidón resistente

En los últimos años, el almidón resistente se ha introducido como un ingrediente funcional importante en la nutrición humana. Éste, al no ser digerido, es una fuente potencial de energía para la microbiota presente en el colon. La fermentación del almidón resistente en el colon da como productos de degradación ácidos grasos de cadena corta (principalmente el acetato, el propionato y el butirato), los cuales disminuyen el pH intestinal (Herrera, 1997). Como resultado de diferentes investigaciones científicas, se ha remarcado la importancia del consumo de almidón resistente debido a que sus funciones son similares a las de la fibra alimentaria. Se han destacado dos aspectos importantes de los efectos del almidón resistente en la salud: sobre la microbiota del colon y el metabolismo, y sobre la función intestinal (**Tabla 17**). Es importante destacar que la mayoría de estos efectos han sido observados con una ingesta de 20–30 g/día de almidón resistente, lo cual excede entre cinco a siete veces la ingesta estimada en la mayoría de los países (Laurentin y Edwards, 2013).

Tabla 17. Importancia del almidón resistente como alimento funcional

Saciedad	Estimulación de la sensación de saciedad en el hombre (Willis y col., 2009).
Respuesta glucémica	Las legumbres (ricas en almidón resistente tipo 1) y los almidones con alto contenido en amilosa (ricos en almidón resistente tipo 2) generan una baja respuesta glucémica (Thorne y col., 1983; Granfeldt y col., 1995).
Metabolismo de los lípidos	Inhibición en los murinos de la síntesis hepática del colesterol y de los triglicéridos (Cheng y Lai, 2000).
pH del colon	La producción de algunos ácidos orgánicos durante la fermentación disminuye el pH luminal del colon. Tal acidificación inhibe el crecimiento de algunas poblaciones microbianas potencialmente patógenas como <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> (Cherrington y col., 1991).
Sales biliares	Las sales biliares secundarias como el desoxicolato, de actividad citotóxica, precipitan con la acidificación del lumen del colon (van Munster y col., 1994).
Proliferación celular del colon	Hay indicios de que el butirato estimula la proliferación celular del colon proximal, pero la inhibe en la porción distal.

Tabla 17. Importancia del almidón resistente como alimento funcional. Continuación

Deposición fecal y tiempo de tránsito	Incremento de la masa fecal como consecuencia de la proliferación bacteriana y de la retención de agua en las heces (Phillips y col., 1995; Cummings y col., 1996; Ferguson y col., 2000).
Micronutrientes	Incremento en los murinos de la absorción intestinal de calcio y magnesio (Younes y col., 2001), y de calcio y zinc en los cerdos infantes (Morais y col., 1996).
Prevención de enfermedades	Prevención del estreñimiento (Nugent, 2005) y un posible rol protector contra el cáncer colorrectal (O’Keefe y col., 2009).

Adaptado de Laurentin y Edwards (2013).

Los alimentos que contienen almidón resistente también moderan la velocidad de la digestión. El almidón resistente es fermentado de 5 a 7 horas después de su consumo, en contraste con el almidón disponible, el cual es digerido casi inmediatamente. Este periodo en el que el AR es metabolizado, reduce la glucemia e insulinemia postprandial e incrementa la sensación de saciedad. La ingesta de almidón resistente reduce la formación de cálculos biliares en comparación con el almidón disponible y disminuye los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre (Carlos-Amaya y col., 2011).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Extracción del almidón de los tubérculos de ñame

El procedimiento de extracción del almidón de los tubérculos de ñame se realizó en el Laboratorio de Polisacáridos Vegetales del Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, utilizando como materia prima entre 400 a 800 gramos de la parte comestible de los tubérculos de cinco clones de ñame (clon venezolano, clon D2, clon D7, clon D8, clon D13), donados gentilmente por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA).

El almidón de los tubérculos del clon colombiano fue extraído en el Laboratorio de Procesos Vegetales de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Pontificia Bolivariana, en Colombia, y enviado a Caracas en un envase sellado. Los almidones del resto de los clones se aislaron de la parte comestible de sus tubérculos según una modificación de la metodología descrita por Pérez y col. (1993) para la obtención del almidón de amaranto. Los tubérculos se lavaron, pelaron y trocearon, y la parte comestible se colocó en bolsas plásticas de sello hermético con agua destilada, las cuales fueron llevadas a congelación por 24 horas aproximadamente. Luego de descongelar la pulpa, ésta se licuó con agua destilada en una licuadora (marca Oster[®] Modelo BLSTMG-W, de 1,5 L de capacidad). Con la ayuda de mallas de muselina, la mezcla obtenida se tamizó para obtener la lechada (constituida por almidón y agua) y el residuo de la pulpa. Este último se lavó con agua destilada (tres veces) para asegurar una exhaustiva extracción del almidón.

Por su parte, la lechada obtenida se centrifugó en una centrifuga marca Sorvall[®] RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifugate; a 2500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se descartó. El paso de centrifugación se repitió, haciendo lavados con agua destilada hasta no observar ninguna capa oscura en la parte superior del sedimento (usualmente tres lavados). El precipitado obtenido (almidón) por este procedimiento se trasvasó a una bandeja de aluminio para ser secado a 50 °C durante 24 horas, en una estufa marca Imperial V. Finalmente, el almidón seco se molió con ayuda de un mortero y luego se tamizó usando un tamiz Tyler con tamaño de malla de 60 mesh, para así obtener el almidón nativo. El almidón extraído de cada clon se pesó para calcular el rendimiento de la extracción y se guardó en envases limpios, sellados y debidamente rotulados.

Por comunicación personal, se supo que para la extracción del almidón del clon colombiano enviado desde Colombia se utilizaron tubérculos frescos, lo cuales se pelaron, se cortaron en cubos pequeños de 3 cm y se colocaron en una solución de amoníaco (0,03 mol/l) por cinco minutos con el objetivo de retirar los mucílagos. Seguidamente, se remojaron durante 30 minutos en una solución de bisulfito de sodio (NaHSO_3) con una concentración de 1500 ppm, en relación 1:5 (p/v). Los cubos se licuaron durante 5 minutos junto con la solución de bisulfito de sodio, en relación 1:1 (v/v). La lechada de almidón se filtró en tamices de tela plástica (malla 80) y el filtrado se dejó sedimentar a 4 °C durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, la mayor parte del líquido sobrenadante se descartó y la lechada de almidón se lavó cinco veces con agua destilada para eliminar los residuos de bisulfito y de las fibras. El último lavado se centrifugó a 2500 rpm durante 12 minutos. El almidón obtenido se secó en una estufa a 55 °C durante 24 horas. Una vez seco, se molió hasta obtener un polvo (malla 100), el cual se almacenó en frascos de plástico con cierre de tapa hermética.

2.2 Determinación de la humedad de los almidones de los tubérculos de ñame.

La determinación de la humedad se realizó según el protocolo descrito por la AOAC International (1984). Para ello, primero se colocaron 12 botes de aluminio vacíos y claramente rotulados en la estufa a 100 °C por una hora para eliminar su humedad. Luego estos botes presecados se colocaron en un desecador para proceder a pesar en cada uno de ellos dos gramos de almidón del clon de ñame correspondiente. Esto permitió determinar la humedad de cuatro clones de ñame simultáneamente, asignándole a cada clon tres botes claramente rotulados para evitar confusión. Finalmente, todos los botes con la muestra de almidón se colocaron cuidadosamente en la estufa a 100 °C, por 24 horas. Este procedimiento se repitió para determinar la humedad de los clones restantes.

2.3 Digestibilidad *in vitro* de los almidones

La digestibilidad de las muestras de almidón de ñame se caracterizó *in vitro* mediante la estimación de los parámetros: almidón disponible, almidón resistente total y tasa de α -amilólisis. Esta última variable se estimó tanto con los almidones crudos como con los gelatinizados.

2.3.1 Estimación del contenido de almidón disponible

Para estimar el contenido de almidón que es potencialmente susceptible al ataque amilolítico, se empleó el método enzimático/colorimétrico descrito por Holm y col. (1986). Los almidones de todos los clones de ñame se analizaron por triplicado y como referencia se utilizó el almidón de papa, marca Potatis mjöl de Lyckeby Stärkelsen (Suecia). Se efectuó la dispersión de una alícuota de 300 mg de peso seco de cada almidón, en 20 ml de agua. Se ajustó el pH de las suspensiones entre 6-7 unidades y se agregó 0,1 ml de la α -amilasa bacteriana termoestable Termamyl[®] 120L (NOVO Biolabs, Bagsvaerd, Dinamarca) para luego incubar las suspensiones en un baño de María a ebullición por 20 minutos con agitación magnética cada 5 minutos, proceso que ocasionó la gelatinización del almidón e inició su hidrólisis.

Las suspensiones obtenidas se dejaron enfriar con agitación constante hasta alcanzar la temperatura ambiente. Una vez atemperadas, se trasvasaron y enrasaron en un balón aforado de 100 ml (primera dilución). Previamente, se preparó una solución 0,5 g/l de amiloglucosidasa de *Rhizopus* sp. (A-7255, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) en buffer acetato de sodio 0,1 mol/l pH 4,75. Esta solución se centrifugó durante 5 minutos a máxima velocidad en una centrífuga de mesa (Clay-Adams) a temperatura ambiente. Del sobrenadante de dicha centrifugación se tomó 1 ml y se agregó en tubos de ensayo junto con 0,5 ml de la preparación diluida de las muestra predigeridas. Esta mezcla se incubó en un baño de María con agitación a 40 °C durante una hora. Luego, la solución se transfirió a un balón aforado de 10 ml, completando el volumen con agua destilada (segunda dilución). Para estimar la cantidad de glucosa liberada, de esta dilución se tomaron 50 μ l y se transfirieron a tubos de ensayo junto con 1 ml de reactivo glucosa oxidasa/peroxidasa (glucosa oxidasa cat. 89250, Industrias Invelab[®], Caracas); incubándose durante 10 minutos a 37 °C.

El fundamento del método de Trinder (1969) para la cuantificación de glucosa se basa en la oxidación enzimática de la glucosa por la acción catalítica de la glucosa oxidasa. Los productos de dicha catálisis son: ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H_2O_2); a su vez el H_2O_2 oxida al cromógeno 4-aminoantipirina en una reacción catalizada por la peroxidasa. Esta última reacción produce una coloración cuya intensidad es proporcional a la

concentración de glucosa presente en el sistema. Con el fin de determinar la concentración de glucosa en cada una de las muestras, se realizó una curva de calibración con 0; 5; 20 y 30 µg de glucosa, a partir de una solución patrón de glucosa de 1 g/l, con un volumen de muestra de 50 µl por tubo, a los cuales se les agregó igualmente 1 ml del reactivo de glucosa oxidasa/peroxidasa, seguido de la incubación bajo las mismas condiciones. Luego de la incubación, se determinó la absorbancia a 510 nm para cada muestra y punto de la curva de calibración. Se calculó la ecuación de la recta de la curva promedio para la determinación de glucosa. La fórmula que se empleó para el cálculo del porcentaje de almidón disponible en base seca se indica a continuación:

$$\text{Almidón disponible (\%)} = \frac{\text{Cantidad de glucosa } (\mu\text{g}) \times 10^{(a)} \times 100^{(b)} \times 0,9^{(c)}}{0,05^{(d)} \times 0,5^{(e)} \times 1000^{(f)} \times \text{peso seco de la muestra (mg)}} \times 100$$

- (a) Volumen final luego de la digestión con amiloglucosidasa, en mililitros
- (b) Volumen final luego de la digestión con Termamyl, en mililitros
- (c) Corrección de glucosa a glucano
- (d) Alícuota tomada para la cuantificación de glucosa, en mililitros
- (e) Alícuota tomada para la digestión con amiloglucosidasa, en mililitros
- (f) Conversión de microgramo a miligramo.

2.3.2 Estimación del contenido de almidón resistente total

Se siguió la metodología propuesta por Goñi y col. (1996), la cual se fundamenta en la estimación del contenido de almidón resistente total, que es la suma del almidón físicamente inaccesible (AR1), el material resistente de gránulos nativos no digeribles (AR2), el almidón resistente debido a retrogradación (AR3) y los complejos de almidón con otros componentes (Tovar, 2001). El método se basa en la hidrólisis consecutiva de las muestras con pepsina y α -amilasa pancreática para obtener el material indigerible insoluble. Este es luego tratado con KOH y amiloglucosidasa, tras lo cual se realiza la cuantificación de la glucosa liberada.

La primera etapa del método busca simular las condiciones estomacales. Los almidones de los tubérculos de ñame se analizaron por triplicado, utilizando como referencia el almidón de *Musa* AAB, *subgrupo Plantain*, plátano hartón. Se colocó una alícuota de 100 mg en peso seco de cada almidón en tubos Córex de 30 ml, se dispersó la muestra con agitación constante agregando en cada tubo 10 ml de buffer KCl-HCl 0,2 mol/l pH 1,5.

Seguidamente, se ajustó el pH a $1,5 \pm 0,02$ a cada una de las suspensiones. A cada tubo se le agregó 0,2 ml de una solución de pepsina 0,1 g/ml (P-7000, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE. UU.) y se incubaron en un baño de María a 40 °C en agitación constante durante 60 minutos, con agitación manual cada 15 minutos.

En la segunda etapa se promueve la hidrólisis del almidón susceptible al ataque amilolítico, proceso que ocurre naturalmente en el intestino delgado. Para ello, se estabilizaron las muestras a temperatura ambiente y a la suspensión se le adicionaron 9 ml de buffer Tris-maleato[®] 0,1 mol/l pH 6,9 junto con 1 ml de solución de α -amilasa pancreática porcina (A-3176, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE. UU.) (40 mg α -amilasa/ml de buffer Tris-maleato[®]). La mezcla se incubó durante 16 horas en un baño de María a 37 °C con agitación constante a una velocidad de 200 r.p.m.

La tercera etapa permite separar el almidón resistente y la fibra (componentes insolubles) de la fracción hidrolizada (componente soluble). Luego de la incubación, las muestras se centrifugaron a $3.000 \times g$ por 15 minutos (entre 0 y 5 °C). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con agitación magnética, realizando un lavado con 10 ml de agua destilada. Luego, se aplicó una segunda centrifugación y se descartó nuevamente el sobrenadante.

En la cuarta etapa se busca separar el almidón resistente de la fibra y promover la hidrólisis del primero. Al sedimento resultante, se le agregaron 3 ml de agua destilada y 3 ml de KOH 4 mol/l, recién preparado, manteniendo la suspensión en agitación vigorosa al momento de añadir la base. La agitación magnética se mantuvo durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionaron 5,5 ml de solución de HCl 2 mol/l, 3 ml de buffer acetato de sodio 0,4 mol/l pH 4,75 y 1 ml de solución de amiloglucosidasa de *Rhizopus* sp. (A-7255, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE. UU.) (4,8 g/l) en buffer acetato 0,1 mol/l pH 4,75 a cada tubo Córex y se incubó la mezcla a 40 °C con agitación magnética constante durante 60 minutos. Una vez atemperada, la mezcla se centrifugó a $3.000 \times g$ durante 15 minutos (entre 0 y 5 °C), recuperando los sobrenadantes.

Los sobrenadantes resultantes se trasvasaron a un balón aforado de volumen apropiado dependiendo de la cantidad de glucosa liberada. Los sedimentos resultantes se

resuspendieron en 10 ml de agua destilada con agitación magnética (lavado) y se centrifugaron una vez más recolectando nuevamente los sobrenadante en sus respectivos balones aforados y completando finalmente el volumen con agua destilada. De cada uno de los balones aforados pertenecientes a las muestras se colocó una alícuota de 30 µl en tubos de ensayo, completando el volumen final (50 µl) con agua destilada. Para el caso de la referencia y el blanco de la enzima, se tomó directamente una alícuota de 50 µl. Por último, se determinó la glucosa liberada en todos los tubos de ensayo aplicando el método enzimático/colorimétrico descrito anteriormente en la determinación del almidón disponible. La fórmula que se empleó para el cálculo del porcentaje de almidón resistente total se indica a continuación:

$$\text{Almidón resistente total (\%)} = \frac{\text{Cantidad de glucosa } (\mu\text{g}) \times V_f^{(a)} \times 0,9^{(b)}}{0,05^{(c)} \times 1000^{(d)} \times \text{peso seco de la muestra (mg)}} \times 100$$

- (a) Vf: Volumen final de la solución que contiene la glucosa liberada a partir del almidón resistente, en mililitros (usualmente 100ml).
- (b) Corrección de glucosa a glucano
- (c) Alícuota tomada para la cuantificación de la glucosa, en mililitros.
- (d) Conversión de microgramo a miligramo.

2.3.3 Estimación de la tasa de α -amilólisis

Se efectuó el método enzimático colorimétrico descrito por Holm y col. (1985), que permite estimar la velocidad a la cual el almidón es hidrolizado a azúcares reductores por la acción catalítica de la α -amilasa pancreática porcina. Este método permite la determinación de la tasa de hidrólisis *in vitro* del almidón de un alimento tal como se ingiere. El almidón es hidrolizado por la α -amilasa y se reduce a azúcares los cuales son reportados como equivalentes de maltosa determinados por un método químico - colorimétrico (Hostettler y col., 1951). Para la estimación de la tasa de α -amilólisis se utilizó como referencia el almidón de maíz, marca “Maizina Americana” de Alfonso Rivas, C.A. (Turmero). Para cada muestra, la cinética de hidrólisis se estimó tanto en el almidón crudo como en el gelatinizado.

Se pesaron, de cada almidón extraído, alícuotas correspondientes a 500 mg de almidón disponible que luego se dispersaron en 50 ml de buffer fosfato Na-K 44mmol/l pH 6,9 con NaCl 7 mmol/l, en fioles de 125 ml. Las muestras a gelatinizar (n = 2) y la referencia se

incubaron en un baño de María a ebullición durante 20 minutos con agitación cada 5 minutos, a fin de promover la gelatinización total del almidón (muestras gelatinizadas). A otras réplicas ($n = 2$) se les determinó la velocidad de hidrólisis, omitiendo la gelatinización previa (muestras crudas). Seguidamente, todas las muestras se incubaron en un baño de María a 37 °C con agitación magnética constante (200 r.p.m.).

Posteriormente, se transfirió una alícuota de 0,2 ml a tubos de ensayo que contienen 0,8 ml de agua destilada y 1 ml del reactivo del ácido dinitrosalicílico (DNS); que contiene 10 g/l de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma-Aldrich Co., St Louis, EE. UU.) disuelto en tartrato de Na-K a 300 g/l en NaOH (16 g/l). Este corresponde al tiempo cero de la reacción hidrolítica. Luego, al remanente de cada muestra en las fioles, se le adicionó 1 ml de solución de α -amilasa pancreática (A-3176, Sigma Chemical Co., St. Louis, EE.UU.) (4 g/l en buffer fosfato Na-K 44 mmol/l pH 6,9 con NaCl 7 mmol/l). Transcurridos 5; 15; 30 y 60 minutos de la adición de la solución de α -amilasa, se tomó una alícuota de 0,2 ml de cada muestra y se agregó en tubos conteniendo 0,8 ml de agua destilada y 1 ml del reactivo de DNS para detener la reacción enzimática. Una vez finalizada la toma de las muestras, los tubos de ensayo para la reacción se incubaron durante 10 minutos en un baño de María a ebullición para comenzar la reacción de oxidorreducción, seguida de una incubación de 3 minutos aproximadamente en un baño de agua a temperatura ambiente para detener la reacción química. Posteriormente se añadieron 15 ml de agua destilada, seguido de agitación por inversión (usualmente, 3 veces).

Con el fin de determinar los mg equivalentes de maltosa liberados de cada muestra por acción de la α -amilasa pancreática, se realizó una curva de calibración con 0; 0,25; 0,5; 1,0 y 2,0 mg de maltosa, a partir de una solución patrón de maltosa de 10 g/l, con un volumen final de 1 ml por tubo, a los cuales se les agregó igualmente 1 ml del reactivo de DNS, seguido de incubación bajo las mismas condiciones. Luego de la incubación se determinó la absorbancia (530 nm) a cada muestra y punto de la curva de calibración. Se calculó la ecuación de la recta de la curva promedio para la determinación de maltosa. El porcentaje de α -amilólisis se calculó para cada tiempo y se expresó en equivalentes de maltosa según la siguiente ecuación:

$$\alpha\text{-amilólisis (\%)} = \frac{\text{Maltosa liberada (mg)} \times 50^{(a)} \times 0,95^{(b)}}{0,2^{(c)} \times \text{Contenido de almidón disponible (mg;p.s)}} \times 100$$

- (a) Volumen de solución donde ocurre la hidrólisis, en mililitros.
- (b) Corrección de maltosa a glucano
- (c) Alícuota tomada para la cuantificación de los azúcares reductores, en mililitros.

2.4 Análisis estadístico

Los cálculos y las regresiones lineales (coeficiente de determinación) de las curvas patrón se realizaron con Microsoft Office Excel[®] 2010 de Microsoft Corporation (Redmond, WA, EE. UU.). Los análisis de varianza (ANOVA de una vía) y la prueba *a posteriori* de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD) se realizaron mediante el programa estadístico Minitab[®] 16 de Minitab Inc. (State College, Pensilvania, EE. UU.). Se utilizó $\alpha = 0,05$ como nivel de significancia. Los gráficos que muestran la cinética de hidrólisis de los almidones de ñame se realizaron con el programa Origin[®] versión 8.5.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Extracción y determinación de la humedad del almidón de los clones de ñame

Como se aprecia en la **Tabla 18**, el rendimiento de extracción del almidón de los clones venezolano, D2, D7, D13 y D8, que oscilan entre 3–5%, fue significativamente menor al reportado para el aislamiento del almidón del clon colombiano (26%), cuyo procedimiento de extracción incluyó la adición de compuestos químicos tales como el bisulfito de sodio (NaHSO_3) previo al momento de hacer el licuado de los trozos de pulpa para su posterior tamizado con las mallas de muselina. La adición de estos compuestos químicos optimiza el proceso de extracción debido a que disminuyen las impurezas y pigmentos que pueda tener la pulpa del tubérculo, dejando al almidón más accesible para su aislamiento.

El aislamiento del almidón de los clones venezolano, D2, D7, D8 y D13, se hizo sin la adición de ningún compuesto químico, resultando rendimientos cercanos al 5% para los almidones de los clones venezolano, D7, D8 y D13 y un rendimiento menor (3%) para el clon D2, del que vale resaltar es el único de los tubérculos utilizados cuya pulpa posee una coloración morada intensa, quizás la responsable de ese menor valor en el rendimiento. La pulpa de los tubérculos de los otros clones de ñame exhiben distintas tonalidades de amarillo (**Figura 22**).

León (1987) reportó un detalle microscópico del corte transversal de un tubérculo de ñame en el que se pudo observar, además de los gránulos de almidón, fibras, cristales de oxalato de calcio, canales de mucílago y en algunos cultivares antocianinas; éstas últimas responsables de la coloración morada de la pulpa del tubérculo del clon D2. La presencia de estos pigmentos antociánicos se evidencia incluso en el color de los gránulos de almidón obtenidos después del secado. Para el caso del clon D2, el almidón resultante mostró una coloración gris clara, en comparación a la coloración blanquizca amarillenta de los almidones nativos de los otros clones.

Tabla 18. Cantidad de almidón obtenido y rendimiento de extracción de los almidones de los clones de ñame.

Muestra	Peso (g)		Rendimiento (%)
	Tubérculo	Almidón obtenido	
Clon venezolano	700	33,58	4,80
Clon D2	500	14,76	2,95
Clon D13	800	39,55	4,94
Clon D8	800	41,00	5,13
Clon D7	400	19,81	4,95
Clon colombiano	500	129,35	25,87

La humedad registrada para los seis clones fue bastante heterogénea. Se reportaron porcentajes entre 5,8 a 12% de humedad, con diferencias significativas entre algunos de ellos. El mayor porcentaje lo obtuvo el clon venezolano, seguido del clon D2, clon D13, los clones D7 y D8 sin diferencias significativas entre ellos, y por último el clon colombiano. La determinación de la humedad para el clon colombiano se realizó dos veces, debido a que con el primer secado se obtuvo un porcentaje mayor al 14% (**Tabla 19**).

Tabla 19. Humedad de los almidones aislados a partir de seis clones de ñame.

Almidón	Humedad (%)
Clon venezolano	11,86 ± 0,15 ^a
Clon D2	8,19 ± 0,04 ^b
Clon D7	6,64 ± 0,15 ^d
Clon D8	6,79 ± 0,20 ^d
Clon D13	7,70 ± 0,10 ^c
Clon colombiano	5,82 ± 0,10 ^e

Los valores son el promedio ± la desviación estándar (n = 3). Para el clon colombiano se determinó la humedad dos veces, en la primera determinación la humedad fue 16,96 ± 0,05%. Los valores con letras iguales no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, Prueba LSD de Fisher)

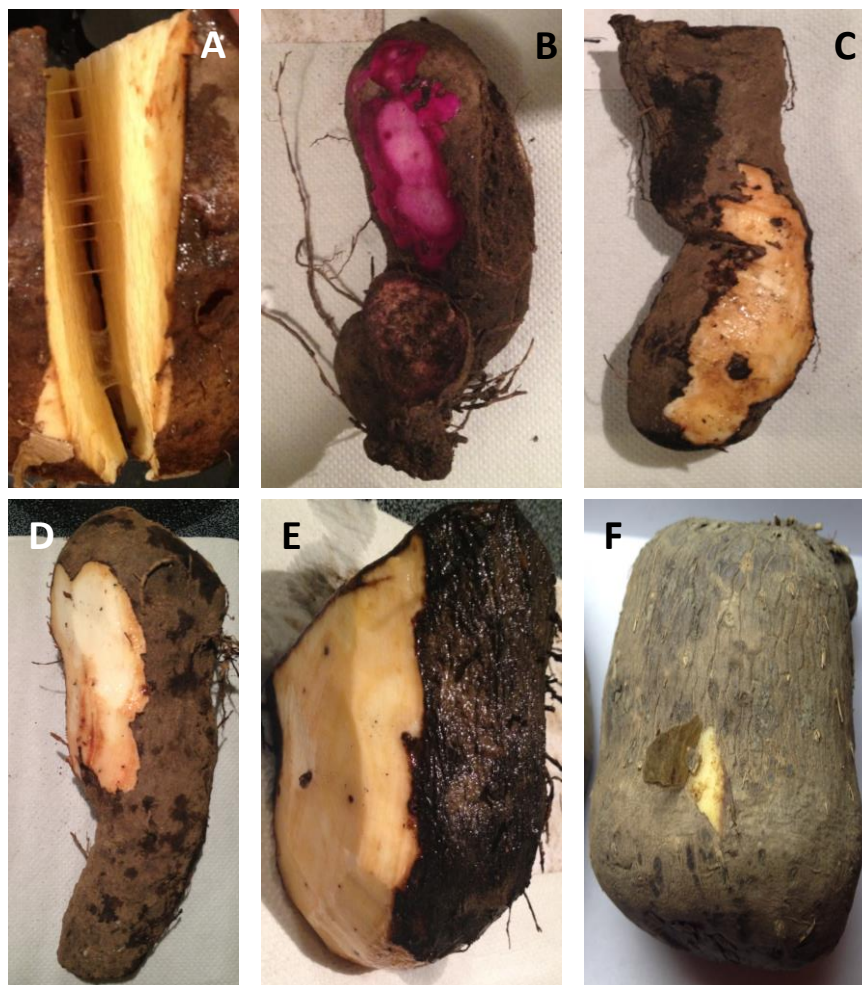


Figura 22. Detalle del color de la pulpa de los tubérculos de los clones de ñame. A. clon venezolano, B. clon D2, C. clon D7, D. clon D8, E. clon D13 y F. clon colombiano.

3.2 Determinación del porcentaje de almidón disponible

Como se ha mencionado en los apartados anteriores, el almidón disponible puede ser medido a través de la glucosa que se libera luego de una digestión con α -amilasa termoestable y amiloglucosidasa (Holm y col. 1986). En la **Tabla 20**, se muestran los resultados obtenidos para el contenido de almidón disponible y de almidón resistente total de los almidones analizados.

Se estimaron altos porcentajes de almidón potencialmente disponible en los almidones de ñame, entre 80 a 89%, encontrándose algunas diferencias estadísticamente significativas entre los almidones de los distintos materiales. El clon venezolano y el clon colombiano mostraron los mayores porcentajes de almidón disponible, mientras que el clon D2 obtuvo el menor porcentaje debido a la presencia de materiales no amiláceos como el mucílago y

las antocianinas, los cuales son considerados contaminantes e impiden la hidrólisis del almidón.

Lovera (2014) reportó el contenido de almidón disponible para otras dos especies tuberosas, apio y mapuey; este último perteneciente a la misma familia del ñame (Dioscoreaceae). Los resultados obtenidos arrojaron $91,2 \pm 1,4\%$ de almidón potencialmente disponible para el apio y $94,0 \pm 1,7\%$ para el mapuey, porcentajes mayores a los reportados en esta investigación.

3.3 Determinación del contenido de almidón resistente total

El método multienzimático de Goñi y col. (1996) permite cuantificar el porcentaje de almidón indigerible presente en los alimentos, lo cual comprende parte del almidón resistente tipo 1, más las fracciones del almidón resistente tipo 2 y tipo 3. Como se explicó anteriormente, debido al modo en que se realizó el aislamiento de estos seis materiales, la fracción de almidón resistente tipo 1 no es cuantificable, por lo que estaríamos estimando solo la fracción de almidón resistente tipo 2, presente en muestras crudas y en estado nativo.

En los almidones de ñame, se estimaron porcentajes muy altos de almidón resistente (superiores al 15%) según la clasificación propuesta por Goñi y col. (1996), valores que resultaron incluso superiores al estimado en el almidón de referencia (**Tabla 20**). El clon venezolano presentó el mayor contenido de almidón resistente, mientras que la fracción más pequeña se encontró en el clon colombiano. Los clones D2, D7, D8 y D13 mostraron porcentajes de almidón resistentes intermedios, sin diferencias significativas entre ellos, pero si con los clones venezolano y colombiano. Se corrobora con estos resultados, el alto tenor de almidón no susceptible al ataque amilolítico presente en los tubérculos de ñame, esencialmente de almidón resistente tipo 2.

Muchos autores atribuyen la resistencia intrínseca del almidón de ñame a la longitud de las cadenas de amilopectina y a su alto contenido en comparación con la amilosa (70,62% de amilopectina contra 28,50% de amilosa, según Vargas y Hernández, 2012).

Se ha reportado que al recortar las cadenas externas de amilopectina mediante tratamientos enzimáticos usando β -amilasa (β -AMI) y la mezcla de β -amilasa-transglucosidasa (β -AMI-TGs), se puede reducir la interacción entre amilosa y amilopectina, lo cual puede contribuir a una asociación amilosa-amilosa, para formar una malla que impide el acceso de las enzimas digestivas, disminuyendo así la velocidad de digestión del almidón e incrementando la fracción de almidón resistente (Hickman y col., 2009).

En la **Tabla 20** se observa que el almidón de clon colombiano, el cual requirió de un doble secado, resultó ser el de menor contenido de almidón resistente. De igual manera, es necesario realizar otros ensayos que corroboren si existe o no una relación entre el doble secado del almidón extraído y la disminución del almidón resistente con respecto al reportado para los otros materiales.

Lovera (2014) reportó que para el almidón aislado de los tubérculos de mapuey, el contenido de almidón resistente total resultó ser muy alto (55,8%), valor intermedio entre el porcentaje obtenido para el almidón del clon D13 (59,21%) y para el almidón del clon colombiano (52,80%). Por otra parte, el almidón aislado de los tubérculos de apio obtuvo un porcentaje de almidón resistente (17,5 %) significativamente menor al reportado para todos los almidones mencionados anteriormente; sin embargo de acuerdo a la clasificación de Goñi y col., (1996) sigue siendo un valor muy alto de almidón resistente (> 15%).

Tabla 20. Contenido de almidón disponible y de almidón resistente total de los almidones aislados de seis materiales de ñame.

Almidón	Almidón disponible (%)	Almidón resistente total (%)
Clon venezolano	89,01 $\pm$ 1,6 ^a	71,26 $\pm$ 1,63 ^a
Clon D2	80,80 $\pm$ 0,7 ^c	60,75 $\pm$ 1,90 ^b
Clon D7	81,94 $\pm$ 1,2 ^{b,c}	60,35 $\pm$ 2,15 ^b
Clon D8	83,87 $\pm$ 1,6 ^b	61,47 $\pm$ 0,87 ^b
Clon D13	84,32 $\pm$ 3,0 ^b	59,21 $\pm$ 2,04 ^b
Clon colombiano	87,56 $\pm$ 0,3 ^a	52,80 $\pm$ 2,47 ^c

Los valores son el promedio $\pm$ la desviación estándar sobre la base seca (n = 3). Los valores con letras iguales en una columna no difieren significativamente ($p > 0,05$; ANOVA, Prueba LSD de Fisher). Como referencia para los ensayos del almidón disponible se utilizó un almidón de papa comercial (94,1 $\pm$ 2,6%; n = 3). Como referencia para el ensayo de almidón resistente total se utilizó almidón de plátano (plátano hartón, AAB) (45,10 $\pm$ 0,11%; n = 3).

3.4 Determinación de la tasa de α -amilólisis

Con la finalidad de conocer la susceptibilidad de cada uno de estos almidones aislados de los tubérculos de los materiales de ñame, se determinó la tasa de α -amilólisis, estimada tanto para los almidones crudos, es decir aquellos que no fueron sometidos a ebullición previa al análisis enzimático, como para los almidones gelatinizados. En la **Figura 23** se muestran las tasas de α -amilólisis obtenidas para cada uno de los clones y en la **Tabla 21** se muestra la velocidad inicial y magnitud final de la hidrólisis de los almidones.

Todos los almidones evaluados en su estado crudo presentaron una velocidad inicial y una magnitud final de hidrólisis muy baja, entre 0,2–1,1% y 0,5–2,1%, respectivamente. La mayor velocidad inicial de hidrólisis de las muestras crudas se encontró con el almidón de clon venezolano, seguida por el almidón de clon D8, mientras que las velocidades más bajas se obtuvieron para los almidones de clon D7 y clon D13. Los almidones de clon venezolano y clon D8 presentaron las mayores magnitudes finales de hidrólisis mientras que el almidón de clon D7 resultó tener la menor magnitud final de hidrólisis.

Las tasas de α -amilólisis de los almidones gelatinizados fueron mucho mayores que las obtenidas para los almidones crudos (**Figura 23**). Con velocidades iniciales comprendidas entre 66–70% y magnitudes finales de hidrólisis entre 88–96%. Los almidones de clon D8 y clon D2 gelatinizados presentaron los mayores valores de magnitud final de hidrólisis, seguido por los almidones de clon D7, clon D13 y clon colombiano, y por último el almidón de clon venezolano resultó tener la menor magnitud final (**Tabla 21**).

Tabla 21. Velocidad inicial y magnitud final de hidrólisis *in vitro* de los almidones de seis clones de ñame

Almidón	Crudo		Gelatinizado	
	Velocidad inicial (%)	Magnitud final (%)	Velocidad inicial (%)	Magnitud final (%)
Clon venezolano	1,13	2,10	67,42	88,10
Clon D2	0,54	1,38	66,57	96,14
Clon D7	0,30	0,48	66,76	94,98
Clon D8	0,64	1,75	70,34	96,29
Clon D13	0,24	1,09	68,89	94,74
Clon colombiano	0,56	1,06	67,60	91,69

Los valores son el promedio del almidón hidrolizado sobre la base de almidón disponible ($n = 2$). La velocidad inicial es la proporción de almidón hidrolizado en los primeros 15 minutos, mientras que la magnitud final es la proporción total de almidón hidrolizado al cabo de los 60 minutos. Como referencia para los ensayos de α -amilólisis se utilizó el almidón de maíz gelatinizado (velocidad inicial: $60,3 \pm 3,01\%$ y magnitud final: $82,9 \pm 2,22\%$; $n = 6$).

En la **Figura 23** se observa gráficamente como todos los valores de hidrólisis de los almidones gelatinizados de ñame superan a los valores obtenidos para el almidón de maíz gelatinizado utilizado como referencia, desde los 5 hasta los 60 minutos. Cuando analizamos los valores de magnitud final de hidrólisis se observa que el almidón gelatinizado más cercano a la referencia es el del clon venezolano, cuya magnitud final se ve claramente separada en el gráfico de la magnitud final obtenida para el almidón del clon colombiano y estos dos, a su vez, se observan separados de los almidones gelatinizados de los clones restantes (D2, D7, D8 y D13), los cuales están solapados y se hace difícil distinguirlos por separado.

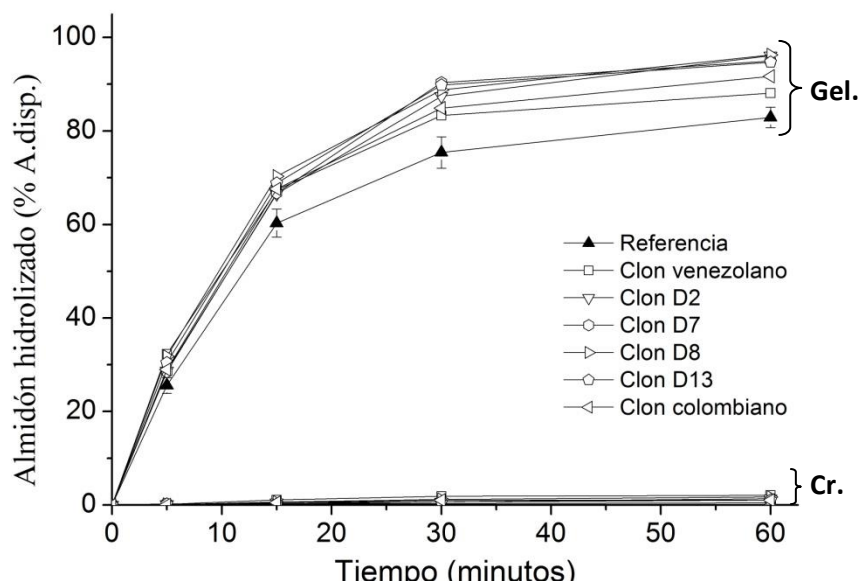


Figura 23. Cinética de hidrólisis *in vitro* de los almidones de los clones venezolano, D2, D7, D8, D13 y colombiano extraídos a escala laboratorio. Cada punto representa el porcentaje de almidón hidrolizado sobre la base de almidón disponible y constituye el promedio de dos determinaciones próximas. Cr: almidón crudo, Gel: almidón gelatinizado. Como referencia para los ensayos de α -amilólisis se utilizó el almidón de maíz gelatinizado.

Blanco-Metzler y col. (2004) en su estudio sobre la caracterización nutricional de los carbohidratos de yuca (*Manihot esculenta*), tiquisque (*Xantosoma* sp.) y ñame (*Dioscorea alata*) cocidos, reportaron que la tasa de amilólisis de la yuca y el tiquisque hervidos resultó semejante (72% y 66% respectivamente a los 60 minutos), mientras que el almidón del ñame presentó un comportamiento diferente y siempre mucho menor (57%) que el de los otros dos productos. Para estos autores, el ñame es muy interesante desde el punto de vista de manejo dietético porque resultó ser el material con menor contenido energético al contener más agua, y cuyo almidón es el de menor velocidad de digestión y por ello, posiblemente, con un índice glucémico menor. Dicha posibilidad debe ser corroborada en estudios *in vivo*.

De la compilación de los resultados obtenidos en esta investigación y como cierre de la sección de discusión, se propone al almidón de clon venezolano como ingrediente para la elaboración de alimentos dirigidos a promover una óptima funcionalidad gastrointestinal, con paso moderado de glucosa a la sangre, por ser el que obtuvo el mayor contenido de almidón disponible y de almidón resistente total, pero a su vez, la menor tasa de hidrólisis.

Asimismo, se propone al almidón aislado de los clones D7, D8 y D13 como ingredientes para la elaboración de alimentos dirigidos a deportistas, que requieran un rápido aporte energético, debido a que ellos también poseen alto contenido de almidón disponible y de almidón resistente total (sin superar el obtenido para el clon venezolano), con las mayores tasas de hidrólisis.

4. CONCLUSIONES

1. Se presume que el procedimiento de extracción del almidón de clon colombiano resultó ser el de mayor rendimiento debido a la adición de bisulfito de sodio, mientras que la extracción del almidón del clon D2 obtuvo el menor rendimiento debido al alto contenido de antocianinas, responsable de la coloración morada de la pulpa del tubérculo, las cuales interfieren con el aislamiento del almidón y lo tiñe de una coloración grisácea.
2. Se reportaron porcentajes de humedad entre 5 y 12%. Con respecto a la digestibilidad, se estimaron altos porcentajes de almidón disponible, entre 80 a 90%. El clon venezolano presentó el mayor contenido de almidón resistente (71%), mientras que la fracción más pequeña se encontró en el clon colombiano.
3. En la determinación de la tasa de α -amilólisis, los almidones evaluados en su estado crudo presentaron una velocidad inicial y una magnitud final de hidrólisis muy baja. Estos valores aumentaron notablemente con el proceso de gelatinización, mostrando velocidades iniciales comprendidas entre 66 – 70% y magnitudes finales de hidrólisis entre 88 – 96%.

CAPÍTULO 4. Micropropagación y microtuberización de seis clones de ñame y su establecimiento en un banco de germoplasma *in vitro*

El ciclo de vida de las plantas de ñame tiene las siguientes fases de desarrollo: propágulos (semillas sexuales o tubérculos), emergencia de las plántulas, planta madura, planta senescente y tubérculos en estado de latencia. En las especies de ñame comúnmente cultivadas, la floración oscila entre nula y profusa por lo que suelen propagarse por vía asexual mediante la siembra de sus tubérculos. Sin embargo, esta técnica de propagación vegetativa no garantiza la producción de volúmenes de material vegetal de plantación con calidad fisiológica, sanitaria y genética en cortos periodos de tiempo. Las enfermedades causadas por hongos, virus o bacterias y la infección por nemátodos reducen drásticamente los rendimientos, especialmente cuando son transmitidas a través de tubérculos enteros, o fragmentos de éstos utilizados como semillas para la nueva generación de la planta. Esto ocasiona que la enfermedad sea transferida de un ciclo a otro y de una localidad a otra, provocando pérdidas significativas en la producción y la posible desaparición de accesiones importantes (Borges y col., 2009a; Ondo Ovono y col., 2010).

Como se mencionó en el Capítulo 2, las plantas se pueden conservar en bancos de germoplasma *ex situ* situados en lugares que son distintos del hábitat natural de la planta. Sin embargo, el correcto mantenimiento de estos bancos de germoplasma es muy costoso, debido a que requieren terrenos muy amplios y elevados costos en insumos y mano de obra (Polzin y col., 2014).

En época de lluvias, las plantaciones de ñame suelen sufrir de constantes anegaciones debido a inundaciones de los terrenos en donde se cultivan, ocasionando la pudrición de los tubérculos e incluso la pérdida total de los individuos pertenecientes a una determinada especie de ñame.

En los últimos años se ha desarrollado una extensa investigación encaminada a buscar métodos alternativos para mejorar los rendimientos del cultivo de ñame y atender las demandas en la agricultura, ello con el propósito de afrontar los inconvenientes derivados del cultivo convencional y el mantenimiento del germoplasma *ex situ* de ñame. Entre estos métodos se encuentran la micropropagación y microtuberización de plantas de ñame con el

propósito de obtener una producción masiva de vitroplantas y microtubérculos libres de patógenos, que puedan ser almacenados en bancos de germoplasma *in vitro* y de esta manera facilitar el intercambio internacional de germoplasma con fines de fitomejoramiento (Polzin y col., 2014).

En este sentido, en este capítulo se evaluó la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (1962) y el fotoperiodo sobre la micropropagación y microtuberización de seis clones de ñame y su posterior establecimiento en el banco de germoplasma *in vitro* del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela.

1. ANTECEDENTES

1.1 Cultivo *in vitro*

El cultivo de tejidos vegetales o cultivo *in vitro* se define como un conjunto de técnicas que presentan en común el hecho de que pequeñas porciones de la planta, tales como protoplastos, células, tejidos u órganos, pueden cultivarse asépticamente en un medio nutritivo, de composición química definida e incubarse bajo condiciones ambientales controladas, teniendo como resultado la producción masiva de plantas libres de patógenos, en un espacio reducido y en corto tiempo (Bhojwani y Dantu, 2013). El pequeño segmento escindido de la planta madre que se utiliza para iniciar el proceso se conoce como explante, siendo la unidad básica en la propagación por cultivo de tejidos (Iriondo y Pita, 1998).

El cultivo *in vitro* puede ser utilizado como herramienta para la obtención de plantas sanas, producción de haploides, aislamiento y utilización de protoplastos, cultivo de embriones, producción de fitoquímicos, ingeniería genética, mutación y selección celular, producción de semillas sintéticas y estudios básicos de anatomía, desarrollo, fisiología y nutrición vegetal, entre otros (Salisbury y Ross, 2000).

El desarrollo de todas las técnicas de cultivo *in vitro* se sustenta sobre el principio de la totipotencia celular, propuesto por Haberlandt en 1902, citado en el trabajo de Villalobos y Thorpe (1993). La totipotencia celular se refiere a la capacidad de regeneración de un organismo completo a partir de una célula vegetal, la cual contiene en su material genético

la información necesaria para expresar durante su ciclo de vida cualquier rasgo morfológico, químico y/o funcional de la célula, tejido o planta. Cuando la totipotencia de las células vegetales fue establecida y se pudo lograr la regeneración de un gran número de plantas utilizando pequeñas secciones de tejido somático, el cultivo de tejidos fue proyectado como una alternativa potencial para la rápida propagación clonal de las plantas (Bhojwani y Dantu, 2013).

El hecho de que el ñame sea un cultivo seriamente afectado por muchas plagas y enfermedades, lo convierte en un importante candidato para la manipulación genética. El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* en el ñame permite principalmente la producción de semilla sana, producción masiva de material vegetal en espacio reducido, conservación de las características genotípicas de un material o aumento de la variabilidad genética preexistente, y la transferencia de genes que le confieran resistencia a enfermedades y mejoren las características agronómicas de este cultivo. Para esto, la regeneración *in vitro* de plantas vía micropropagación, organogénesis o embriogénesis somática es un prerequisite. Se ha reportado, para diferentes especies de *Dioscorea*, una eficiente regeneración de plantas a partir de una gama de explantes tisulares, incluyendo hoja, tallo y tubérculo, logrando evadir varias dificultades inherentes a los métodos convencionales de propagación (Bonilla y Hernández, 2012).

1.2 Micropropagación

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, tales como segmentos de tallo con yemas que se encuentran en las axilas o primordios de las hojas o meristemos aislados. Estos se cultivan asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en el que se puedan controlar estrictamente las condiciones del ambiente y la nutrición, teniendo como resultado plantas genéticamente idénticas a la planta parental (Arellano y col., 2010).

El objetivo de la micropropagación es producir masivamente y en corto tiempo material libre de patógenos, con cualidades deseables, genéticamente uniformes y estables. Sin embargo, para lograr el éxito de la propagación clonal, es importante tener en cuenta el genotipo de la planta, su edad fisiológica, la selección del explante, el suministro de

nutrientes al medio de cultivo, el empleo de reguladores de crecimiento y las condiciones ambientales para el desarrollo de las plántulas (Arellano y col., 2010).

Según Quintero y col. (2003), el proceso de micropropagación comprende 5 etapas bien definidas, cada una con sus requerimientos específicos:

a) Etapa 1. Preparación del material vegetal que será utilizado como explante

Esta etapa es muy importante e indispensable debido a que el chequeo previo del material vegetal tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso, desde el punto de vista sanitario, fisiológico y genético. Se recomienda que para obtener explantes de óptima calidad primero se cultiven las plantas donantes en condiciones de invernadero donde se pueden inducir nuevos brotes y tratar las plantas con fungicidas o bactericidas.

b) Etapa 2. Establecimiento o iniciación del cultivo

En esta etapa se realiza el aislamiento estéril de los explantes y se cultivan en medios simples o suplementados con reguladores de crecimiento que permitan inducir el proceso. El éxito de esta etapa depende de la elección del explante correcto, de un procedimiento de esterilización adecuado y de la prevención de las reacciones de hipersensibilidad de los explantes.

c) Etapa 3. Multiplicación

En esta etapa se induce a la multiplicación de los brotes de las plantas establecidas *in vitro*, utilizando para ello medios con reguladores de crecimiento que promueven la producción de un mayor número de brotes, los cuales posteriormente deben separarse y subcultivarse en medios frescos para su desarrollo.

d) Etapa 4. Enraizamiento

Los brotes obtenidos en la etapa anterior son tratados para inducir el enraizamiento bien sea *in vitro* o *in vivo* y obtener plantas completas. Para lograr el enraizamiento *in vitro* se utilizan reguladores de crecimiento, principalmente auxinas, debido a que estas promueven la formación de raíces laterales y adventicias. Por otra parte, el enraizamiento *in vivo* tiene

ventajas debido a que la formación de las raíces y la aclimatación en condiciones de campo ocurren simultáneamente.

e) Etapa 5. Aclimatación

Esta es la etapa más difícil del cultivo, cuando las plántulas salen del ambiente estéril, con alta humedad, baja intensidad lumínica, temperatura constante, baja evaporación y medios de cultivo ricos en nutrientes, para iniciar su desarrollo en tierra. Esta fase requiere de condiciones adecuadas y grandes cuidados para que las vitroplantas no mueran por desecación debido a la alta evaporación o por el ataque de microorganismos. Por lo tanto, en esta fase se debe contemplar el control minucioso de los parámetros ambientales (humedad, temperatura y luz), de tal manera que permita disminuir la deshidratación y estimular la fotosíntesis con el objeto de generar un rápido crecimiento de las plantas. La fase de aclimatación es trascendental para la micropropagación comercial, pues del resultado de ésta, dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso.

1.2.1 Ventajas de la micropropagación

Según Das y col. (2013a), la importancia de la micropropagación está basada en las siguientes ventajas:

- Se pueden producir un gran número de plantas a partir de porciones muy pequeñas de un solo individuo, en un espacio reducido y en corto tiempo, siendo réplicas exactas entre si y fieles copias de la planta progenitora.
- Permite la obtención de plantas de alta calidad fitosanitaria, ya que al someter el tejido vegetal a este sistema de cultivo se eliminan totalmente las enfermedades de tipo bacteriano y fúngico y en algunas ocasiones las de tipo viral.
- Facilita el almacenamiento y el transporte de vitroplantas sanas, eliminando las largas cuarentenas a las que debe someterse el material vegetal *in vivo* cuando se desea introducir de un país a otro.
- La velocidad de multiplicación *in vitro* es a menudo mucho más rápida que en los métodos convencionales de propagación vegetativa debido a que en el cultivo *in vitro* es

posible manipular de una manera más eficiente el suplemento de nutrientes y reguladores de crecimiento, las condiciones lumínicas y la temperatura.

- El número de individuos obtenidos por este método es muy superior al obtenido por cualquier otro método de propagación, por unidad de propágulo.
- La micropropagación se puede llevar a cabo en muchos genotipos para los cuales la propagación vegetativa convencional es difícil o imposible.
- La micropropagación permite el mantenimiento de los cultivos en crecimiento mínimo cuando hay baja demanda en los mercados.

1.2.2 Problemas comunes durante la micropropagación

1.2.2.1 El enraizamiento

La mayoría de las plantas pueden formar raíces de manera natural durante el proceso de micropropagación, sin el requerimiento de una etapa adicional de enraizamiento. Sin embargo, algunas especies pueden manifestar deficiencia en la formación de raíces dificultando su transferencia a condiciones de invernadero. La inducción puede lograrse incorporando auxinas al medio de cultivo. Bhojwani y Dantu (2013) señalan que una longitud de 5-10 mm es suficiente ya que una raíz más larga puede dañarse en el momento del trasplante. Esta longitud se obtiene generalmente dentro de 10-15 días de cultivo.

1.2.2.2 Hiperhidratación

A menudo, los vástagos regenerados bajo ambientes de alta humedad y condiciones heterotróficas dentro del recipiente de cultivo, muestran anomalías morfológicas, anatómicas, fisiológicas y metabólicas. Tales plantas, conocidas como vitrificadas o hiperhidratadas, presentan una apariencia vidriosa, traslucidas, hojas suculentas o carnosas y con tallos rígidos, gruesos y quebradizos (Toledo y col., 1998).

Otras anomalías asociadas con estas plantas, son la pobre diferenciación del mesófilo con el tejido en empalizada ausente o muy reducido, la deficiencia de clorofila, la pobre lignificación, la poca diferenciación interna de los cloroplastos, la deposición defectuosa de cera en las hojas. Así mismo, los estomas permanecen abiertos incluso en la oscuridad, sin responder al estrés hídrico. La hiperhidratación de los brotes es uno de los problemas más

graves en la micropropagación comercial debido a que estos brotes anormales exhiben un pobre enraizamiento y supervivencia luego del trasplante (Bhojwani y Dantu, 2013).

1.2.2.3 Contaminación

La contaminación es un problema muy serio para muchos laboratorios de cultivo de tejidos, especialmente para un laboratorio comercial, debido a que esto puede causar enormes pérdidas económicas. En los laboratorios comerciales bien establecidos, este problema se acentúa por el hecho de que el tipo de contaminación cambia con el tiempo. Inicialmente, las contaminaciones bacterianas son debidas a las bacterias asociadas con las plantas, pero con el paso del tiempo las bacterias asociadas con los seres humanos pueden aparecer. El problema de la contaminación se agrava por las bacterias latentes, de crecimiento lento, que pueden permanecer en el interior del tejido sin detección y hacen su aparición en una fase muy tardía, cuando todo estaba aparentemente sano. La infección latente también puede resultar en necrosis de los tejidos, reducción de la proliferación de brotes y pobre enraizamiento (Borges y col. 2009b).

El movimiento de los seres humanos en el área limpia no se puede evitar, y con ello la introducción de bacterias y esporas de hongos que se llevan sobre el cabello o la ropa y se quedan en el área estéril. Sin embargo, esto se puede disminuir si se restringe la entrada hacia el área limpia y se utilizan trajes especiales. Por otra parte, debe realizarse una fumigación frecuente con formaldehído o tiabendazol para reducir la incidencia de contaminación en el laboratorio (Toledo y col., 1998).

Otro grave problema es la presencia de insectos en las salas de cultivo los cuales se multiplican rápidamente y causan estragos, destruyendo un gran número de cultivos en corto tiempo. Los ácaros son otra plaga que puede multiplicarse rápidamente en recipientes de cultivo. Estos no pueden ser detectados a simple vista y su presencia se hace evidente sólo después de la infección microbiana, sobre todo por hongos. La infección por hongos se propaga tan rápido que descartar los cultivos se convierte en la única forma de control (Bhojwani y Dantu, 2013).

Se debe hacer la comprobación periódica de cultivos contaminados y los que se encuentran infectados deben ser removidos inmediatamente. La consecuencia más evidente de contaminación de los cultivos es la pérdida de tiempo, dinero y esfuerzo invertidos en el establecimiento y desarrollo de las plantas. También puede afectar negativamente las investigaciones que se lleven a cabo en los laboratorios, dando lugar a resultados experimentales inexactos o erróneos y a la pérdida de productos valiosos (Das y col., 2013a).

1.2.2.4 Oxidación fenólica

Muchas plantas leñosas y algunas especies herbáceas cuando se cultivan *in vitro* producen el oscurecimiento del medio por la liberación de fenoles. Los productos de oxidación de los fenoles pueden ser fitotóxicos. Algunas veces el oscurecimiento es tan intenso que los explantes también se tornan marrones o negros, se vuelven necróticos y eventualmente mueren (Quintero y col., 2003).

El grado de oscurecimiento del explante depende de la especie o el genotipo de la planta donante, la edad del tejido (los tejidos jóvenes son menos susceptibles al oscurecimiento que los más maduros) y la composición del medio de cultivo. Un método simple para proteger el explante es su subcultivo frecuente (cada 2 a 3 días) en un medio fresco. La fotooxidación de fenoles se puede reducir manteniendo inicialmente los cultivos en la oscuridad. Los elementos tales como Mn^{2+} y Cu^{2+} , que son cofactores para las enzimas peroxidasa y fenolasa, respectivamente, deben ser reducidos o eliminados para inactivar estas enzimas y evitar el oscurecimiento. Algunas veces la adición de antioxidantes tales como el ácido ascórbico (AA), la cisteína-HCl o el ácido cítrico al medio de cultivo ayuda a frenar el oscurecimiento de los explantes y del medio (Bhojwani y Dantu, 2013).

Por otra parte, la povidona (PVP) y el carbón activado son otros compuestos químicos que pueden añadirse al medio de cultivo para ayudar a prevenir el oscurecimiento. Ellos son capaces de absorber fenoles pero también pueden absorber compuestos útiles presentes en el medio de cultivo, por lo tanto, se deben utilizar a una concentración adecuada para evitar la sustracción de nutrientes o algún otro compuesto necesario para el desarrollo de las plantas (Toledo y col., 1998).

1.2.2.5 Especies recalcitrantes

Algunas especies son recalcitrantes en condiciones *in vitro*, es decir, sus células vegetales, tejidos y órganos no son capaces de responder a las manipulaciones del cultivo de tejidos. Esto puede ocurrir en todas las etapas del crecimiento de la planta y se conoce poco acerca de los factores que lo causan. El éxito de la biotecnología vegetal depende en gran medida de la capacidad para regenerar plantas completas a partir de pequeñas secciones de ellas (células, tejidos u órganos), en este sentido la característica de recalcitrante puede ser un factor limitante para la explotación biotecnológica de las especies vegetales de importancia económica y también puede poner en peligro la aplicación de técnicas de conservación *in vitro*. Esta condición puede ser superada utilizando como explante los tejidos más jóvenes o el pre-tratamiento de éstos con citoquininas que pueden rejuvenecer las plantas donantes (Das y col., 2013a).

1.2.3 Micropropagación de ñame

La micropropagación de las plantas de ñame ha alcanzado un significativo auge principalmente en los países productores de este cultivo: Nigeria, Costa de Marfil y República Democrática del Congo, formando parte de sus programas nacionales de semilla para la producción de material vegetal para la siembra (Balogun, 2009).

Muchos investigadores recomiendan la micropropagación de ñame para la producción de semillas, la colección y la distribución de germoplasma a nivel mundial y para el hallazgo de clones de interés en la agricultura. Las técnicas de cultivo de meristemas han sido utilizadas exitosamente para producir altos rendimientos de plantas de ñame libres de patógenos (Perea y Buitrago, 2000).

Los primeros trabajos sobre micropropagación se llevaron a cabo en la década de los años 70 por Ammirato (1976), quien utilizó segmentos nodales de *Dioscorea alata* logrando la regeneración exitosa de plantas de ñame en corto tiempo. Desde esa fecha y hasta la actualidad, se han publicado una gran cantidad de trabajos relacionados con la micropropagación de distintas especies de ñame, tanto comestibles como silvestres; a continuación algunos antecedentes al respecto.

Chen y col. (2003), desarrollaron un protocolo para la micropropagación de *Dioscorea zingiberensis* a partir del cultivo de segmentos nodales, reportando que el medio suplementado con 4,4 μM de Benciladenina (BA) y 1,1 μM de Ácido Naftalenacético (ANA), permitió el desarrollo de las yemas laterales y el crecimiento de los vástagos hasta alcanzar una longitud promedio de 50 mm a los 20 días de cultivo.

Poornima y Ravishankar (2007), lograron establecer la micropropagación de dos especies silvestres de ñame, *D. oppositifolia* y *D. pentaphylla*, a partir del cultivo de segmentos nodales en medios Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementados con 8,8 μM de BA, reportando 7,50 brotes/explante para *D. oppositifolia* y 5,16 brotes/explante para *D. pentaphylla*. El enraizamiento se logró subcultivando las plantas en medio MS con 2,7 μM de ANA obteniendo raíces con una longitud promedio de 7,83 cm para *D. oppositifolia* y 3,50 cm para *D. pentaphylla*.

Ezeibekwe y col. (2009), evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de auxinas y citoquininas sobre la regeneración *in vitro* de *D. rotundata*, reportando que la combinación 0,5 mg/l de ANA con 0,2 mg/l de BA incrementó el número de las hojas (7,80), brotes (9,40) y raíces (15,20), a las 10 semanas de cultivo.

Behera y col. (2010a), lograron la micropropagación de *D. bulbifera* a partir de segmentos nodales, reportando que la multiplicación de los brotes (8,5 brotes/explante) se obtuvo en medios MS suplementados con 2 mg/l de Cinetina (K), 1 mg/l de BA y 0,5 mg/l de ANA, con un enraizamiento profuso (5,8 raíces por planta) cuando las plantas fueron subcultivadas en medios MS con 2 mg/l de ANA.

Yan y col. (2011), evaluaron la micropropagación de plantas de *D. fordii* reportando que el mejor medio para la multiplicación de los vástagos resultó ser el medio MS líquido, suplementado con 1 mg/l de BA, 0,1 mg/l de ANA y 30 g/l de sacarosa, con vástagos de 4,5 cm de longitud y 306,8 mg de peso fresco.

Borges y col. (2011), optimizaron un medio de cultivo para la micropropagación de las plantas de *Dioscorea alata*, reportando que la disminución de la concentración de las sales

de MS al 75% y la adición de ANA/BA (0,01/0,01 mg/l), incrementaron el número de brotes (3,5), la longitud de los vástagos (4,1 cm), el número de hojas (3,8), número de raíces (5,7) y la longitud de las raíces (6 cm), a los dos meses de cultivo.

Thankappan y Abraham (2012), desarrollaron un protocolo para la micropropagación de *D. wallichii* utilizando segmentos nodales cultivados en medios MS suplementados con distintas concentraciones de BA y sacarosa, reportando que el medio MS suplementado con 2 μ M de BA y 8% de sacarosa permitió el crecimiento vigoroso de los vástagos (11,8 cm de longitud) a los 17 días de cultivo.

En el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, también se han desarrollado algunos trabajos relacionados con la optimización de los sistemas de regeneración *in vitro* para las plantas de ñame.

Royero y col. (2007), al establecer un sistema de regeneración *in vitro* para *Dioscorea alata*, encontraron que el medio MS (1962) suplementado con 0,5 mg/l de BA resultó ser óptimo para la inducción de brotes, reportando 4,90 brotes por explante a los 45 días de cultivo.

Cabrita (2014), logro optimizar la micropropagación de plantas de ñame, clon colombiano reportando que la mayor longitud de los brotes ($6,7 \pm 0,8$ cm) se obtuvo en vitroplantas cultivadas en medios líquidos MS (1962) suplementado con 75 g/l de sacarosa y bajo luz blanca continua, a los dos meses de cultivo.

El trabajo más reciente lo realizó Durango (2015), quien estableció un protocolo para la obtención de plantas de ñame de los clones Diamante 22 y Concha de coco, vía embriogénesis somática a partir de segmentos de tallo y de raíz. En este trabajo se logró inducir la embriogénesis somática en los dos clones utilizando 1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). A los 49 días se formaron 11 embriones somáticos por explante a partir de segmentos de raíces y a los 56 días se formaron 9 embriones somáticos por explante a partir de entrenudos de tallo. Los embriones somáticos maduros se

subcultivaron en medios de cultivo MS (1962) con 30 g/l de sacarosa y 0,5 mg/l de BA, regenerándose plantas a las 9 semanas de cultivo.

1.3 Microtuberización

Las numerosas investigaciones que se han llevado a cabo con relación a la micropropagación de distintas especies vegetales, validan el éxito de este proceso y lo colocan entre las principales alternativas de propagación vegetativa utilizadas actualmente para beneficio de la humanidad. Sin embargo, se han reportado algunos inconvenientes relacionados con el establecimiento de las plántulas obtenidas *in vitro* cuando son transferidas a condiciones de invernadero, tales como muerte por desecación, ineficiencia del sistema fotosintético, malformación de hojas y raíces, ataque de patógenos, entre otros (Balogun, 2009).

Afortunadamente, para el caso de las especies tuberosas, existe una alternativa factible para superar los inconvenientes que se presentan durante la aclimatación de las vitroplantas. Algunas especies vegetales capaces de producir de manera natural órganos de almacenamiento tales como tubérculos, cormos, bulbillos o rizomas, pueden también producirlos bajo condiciones de cultivo *in vitro*, proceso que se conoce como microtuberización. La microtuberización consiste en la obtención de microtubérculos en condiciones *in vitro* a partir de explantes nodales o apicales empleando para su formación y crecimiento medios de cultivo y condiciones de incubación idóneas para la propagación (Bonilla y Hernández, 2012).

El uso de microtubérculos en condiciones de invernadero posee ciertas ventajas sobre las vitroplantas, debido a que ellos después de ser cosechados pueden sembrarse directamente en campo sin pasar por la delicada etapa de aclimatación. Generalmente, los microtubérculos son utilizados como semillas libres de patógenos, obtenidos en corto tiempo en comparación al tiempo que tarda la formación de tubérculos de manera convencional (Perea y Buitrago, 2000).

Adicionalmente, los microtubérculos pueden ser utilizados como un medio para el intercambio de germoplasma debido a que ellos son más tolerantes a las variaciones de luz

y de temperatura y son menos propensos al daño que las vitroplantas. Además, el mantenimiento de las vitroplantas a menudo requiere subcultivo frecuente mientras que los microtubérculos pueden ser almacenados por largos periodos de tiempo sin perder su viabilidad y el establecimiento en campo es relativamente fácil y económico (Olivier y col., 2012).

Los microtubérculos pueden almacenarse hasta 10 meses en envases estériles a 4 °C para ser utilizados bien sea como semilla en condiciones de invernadero o como material vegetal de partida para la propagación *in vitro* de plantas, en lugar de cultivar segmentos nodales (Balogun, 2009). Debido a todas estas características, los microtubérculos representan un sistema ventajoso sobre todo para el establecimiento de programas de producción y certificación de semillas de alta calidad (Perea y Buitrago, 2000).

1.3.1 Microtuberización de ñame

Se están haciendo esfuerzos en distintos laboratorios de biotecnología vegetal para explotar la capacidad inherente de muchas especies tuberosas, entre ellas las pertenecientes al género *Dioscorea*, para producir microtubérculos con el fin de facilitar la transferencia internacional de germoplasma y también la velocidad de los procedimientos de introducción al campo (Ondo Ovono y col., 2009; Balogun, 2009).

Al igual que en la micropropagación, son numerosas las investigaciones reportadas sobre la microtuberización de las distintas especies de *Dioscorea*, entre ellas podemos citar: *Dioscorea alata* (Cabrera y col., 2005, 2011; Fotso y col., 2013), *Dioscorea rotundata* (Klu, 2002; Balogun, 2009; Polzin y col., 2014), *Dioscorea cayenensis* (Balogun, 2009; Ondo Ovono y col., 2009), *Dioscorea floribunda* (Sengupta y col., 1984), *Dioscorea bulbifera* (Mantell y Hugo, 1989; Islam y col., 2008), *Dioscorea opposita* (Mantell y Hugo, 1989; Li y col., 2014), *Dioscorea abyssinica* (Jean y Cappadocia, 1991), *Dioscorea wallichii* (Thankappan y Abraham, 2012), *Dioscorea fordii* (Yan y col., 2011), *Dioscorea nipponica* (Chen y col., 2007) y *Dioscorea composita* (Alizadeh y col., 1998).

Existen algunos antecedentes de trabajos venezolanos relacionados con la microtuberización de ñame, entre ellos podemos citar a Royero y col. (2007) y a Cabrita

(2004), quienes optimizaron un protocolo para la regeneración *in vitro* de plantas de ñame, reportando que el 82,1% de las plantas regeneradas produjeron microtubérculos y que la mayor cantidad de ellos (1,3) se obtuvo en medios semisólidos, con 1/5 de las sales de Murashige y Skoog (1962) y fotoperiodo, a los seis meses de cultivo.

La microtuberización de las plantas de ñame además de ser considerada como un eficiente sistema de propagación, también permite conservar y mantener el germoplasma, puesto que el mantenimiento de las colecciones *in vivo* es complejo y costoso. Además permite evaluar la producción de semillas élite en invernadero, como primera etapa de un programa de producción de semillas de ñame (Bonilla y Hernández, 2012).

Sin embargo, a pesar de las probadas virtudes de la micropropagación y la microtuberización, son numerosos los factores que pueden afectar estos procesos, lo cual conlleva a la necesidad de optimizar las mejores condiciones de cultivo para así obtener los mayores rendimientos de vitroplantas y microtubérculos (Ondo Ovono y col., 2009).

1.4 Factores que afectan la micropropagación y la microtuberización de ñame

Como se ha mencionado anteriormente, el principal problema en el cultivo de las especies de *Dioscorea* para propósitos comerciales es el uso de protocolos tradicionales deficientes en propagación sexual y asexual (Ondo Ovono y col., 2009). En este sentido, algunos estudios han estado dirigidos a desarrollar protocolos de micropropagación y microtuberización de ñame. Sin embargo, la respuesta de los explantes puede verse afectada por factores tales como el genotipo, su estado fisiológico, la selección del explante, la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo, la concentración de sacarosa, la temperatura, la luz y el fotoperiodo (Cabrera y col., 2005). A continuación se explican algunos de ellos.

1.4.1 Selección del explante

La mayoría de los investigadores dedicados a optimizar el proceso de micropropagación y microtuberización de las distintas especies de *Dioscorea* utilizan como explante pequeños segmentos de tallo con una o dos yemas axilares reportando excelentes resultados (Alizadeh y col., 1998; Behera y col., 2010b; Mahesh y col., 2010; Yan y col., 2011; Das y

col., 2013b; Polzin y col., 2014). Sin embargo, también se ha logrado establecer dichos procesos de propagación *in vitro* utilizando otros explantes tales como meristemas axilares (Grewal y col., 1977); semillas (Heping y col. 2008), entrenudos, hojas y peciolo (Shu y col., 2005), raíces (Twiford y Mantell, 1996), inflorescencias (Huang y col., 2009) y tubérculos (Savikin-Fodulovic y col., 1998; Xu y col., 2009).

Según Balogun (2009), las vitroplantas de ñame micropropagadas a partir de explantes tomados de plantas que crecen en condiciones de invernadero producen más microtubérculos que las vitroplantas obtenidas a partir de explantes tomados de plantas cultivadas *in vitro*. Este autor comenta que esto puede deberse a una mejor aireación y por lo tanto vigorosidad de la planta *ex vitro* en comparación a los vástagos de las plantas que crecen en condiciones *in vitro*.

1.4.2 Medios de cultivo: concentración de las sales que lo componen y su consistencia física

Villalobos y Thorpe (1993), comentan que un aspecto importante en el cultivo *in vitro* es la preparación del medio en el que crecerán las nuevas plantas, el cual se compone de una mezcla de sales minerales, vitaminas, reguladores de crecimiento, azúcar, agua y opcionalmente agar.

La formulación descrita por Murashige y Skoog (MS, 1962) es comúnmente utilizada para la propagación *in vitro* de varias especies vegetales, incluyendo las del género *Dioscorea*, debido a que reúne todos los macro y micronutrientes esenciales para el desarrollo de las plantas. La composición del medio depende de la especie vegetal con la que se esté trabajando, por ejemplo para el cultivo de ñame se utiliza el medio Murashige y Skoog (1962) suplementando con vitaminas, reguladores de crecimiento, sacarosa y en algunas ocasiones antioxidantes (Rigato y col., 2001).

Sin embargo, es importante destacar que no siempre el medio Murashige y Skoog con la formulación completa de las sales que lo componen, es ideal para los procesos de micropropagación y microtuberización de ñame. Algunas veces es necesario reducir la

concentración de las sales a la mitad o incluso menos para lograr establecer dichos procedimientos de propagación *in vitro* (Borges y col., 2011).

El exceso de sal en el suelo o en las soluciones interfiere con los procesos fisiológicos y bioquímicos, originando problemas como deficiencia mineral, estrés osmótico, toxicidad por el ion y estrés oxidativo. Igualmente, la concentración de las sales en el medio de cultivo *in vitro* afecta el desarrollo de los procesos de regeneración. Durante el crecimiento de algunas especies vegetales, se ha reportado que la concentración completa de las sales de MS es muy tóxica y dificulta la multiplicación de los brotes y el enraizamiento, por lo que en algunas ocasiones es necesario reducirla (Rai y col., 2011).

El efecto promotor de reducir la concentración de las sales de MS podría deberse a la reducción del nitrógeno, especialmente el nitrato de amonio (NH_4NO_3), lo cual se ha reportado que incrementa la velocidad de multiplicación y enraizamiento en algunas especies vegetales. En los protocolos de micropropagación de ñame, la reducción de las sales en el medio de cultivo es utilizada principalmente para promover el enraizamiento de las vitroplantas. Sin embargo, algunos autores han reportado que la reducción de las sales también favorece la formación de microtubérculos (Bhojwani y Dantu, 2013).

Chen y col. (2007), evaluaron el efecto de los reguladores de crecimiento y la sacarosa en la micropropagación y microtuberización de *Dioscorea nipponica*, reduciendo a la mitad la concentración de las sales de MS (1962) y suplementando el medio con 0.5 mg/l de ANA y 1 mg/l de BA, reportando un porcentaje de enraizamiento del 95% de las vitroplantas cultivadas.

Behera y col. (2010b), subcultivaron las vitroplantas de *D. alata*, obtenidas a partir del cultivo de segmentos nodales, en medios con la concentración de las sales de MS reducidas a la mitad y suplementados con 2 mg/l de ANA, logrando un enraizamiento del 92% de las vitroplantas, con un promedio de 5,5 raíces/plantas y una longitud promedio de 5,2 cm.

Kohmura y col. (1995), citados por Royero y col. (2007), lograron la regeneración de plantas y la formación de microtubérculos de *D. opposita* a partir de microesquejes

cultivados en un medio de cultivo con 1/5 de las sales de MS, sin la adición de reguladores de crecimiento.

Por otra parte, la consistencia física del medio de cultivo también influye en la micropropagación y microtuberización de ñame. La micropropagación puede llevarse a cabo en medios de cultivo semisólidos o líquidos. Según Jara (1996), los medios de cultivo solidificados con agar son comúnmente utilizados para la conservación de germoplasma y la producción masiva de plántulas libres de patógenos, incluyendo su posterior comercialización. Este medio ofrece la ventaja de mantener por más tiempo el cultivo de las plantas, sin necesidad de refrescarlo cada dos o tres semanas, lo cual disminuye el riesgo de contaminación del explante al no tener que perturbar las condiciones de esterilidad en las que fue cultivado.

George y col. (2008) señalan que el medio líquido es utilizado principalmente para el cultivo de protoplastos, la obtención de metabolitos secundarios a partir de raíces, la propagación de embriones somáticos y meristemas nodulares y la formación de microtubérculos a partir de vitroplantas micropropagadas. Este medio ofrece la ventaja de proporcionar un buen intercambio gaseoso y facilitar la difusión de las sustancias tóxicas (fenoles) en el medio en agitación.

Kadota y Niimi (2004) estudiaron la micropropagación de *Dioscorea japonica* variando la consistencia física del medio de cultivo, concluyendo que la proliferación de los vástagos en medio MS (1962) líquido fue superior a la obtenida en medio MS (1962) sólido en el número de nudos (6,9 y 2,1 respectivamente) y en el peso fresco (283,4 y 51,9 mg respectivamente). Por otra parte también reportan que para el enraizamiento, el medio de cultivo sólido fue superior al medio de cultivo líquido en frecuencia de enraizamiento, pero el número de raíces en ese medio fue inferior al obtenido en medio líquido.

Yan y col. (2011) establecieron un protocolo para la propagación *in vitro* de *Dioscorea fordii* utilizando medios de cultivo sólidos y líquidos, reportando que la longitud, peso fresco y peso seco de los vástagos micropropagados, así como la frecuencia de tuberización

y el número promedio de microtubérculos por vitroplanta fueron significativamente mayores en el medio de cultivo líquido en comparación con el medio sólido.

1.4.3 Reguladores de crecimiento en el medio de cultivo

El crecimiento y desarrollo de las plantas está regulado por sustancias químicas denominadas reguladores de crecimiento, que en conjunto ejercen una compleja interacción para inducir o inhibir algunos procesos fisiológicos de la planta. Las hormonas vegetales que regulan los principales procesos fisiológicos de las plantas se agrupan en: auxinas, giberelinas, citoquininas, ácido abscísico y etileno (Taiz y Zeiger, 2006).

El éxito del cultivo de tejidos depende mucho de la concentración e interacción de estos reguladores de crecimiento incluidos en el medio de cultivo. Por ejemplo, el inicio de la multiplicación de los brotes, el enraizamiento y la formación y diferenciación de callo están regulados por la concentración de auxinas y citoquininas. La benciladenina (BA) es frecuentemente utilizada para promover el crecimiento y desarrollo de los microtubérculos. Usualmente esta hormona estimula la división celular, especialmente en combinación con algún tipo de auxina, como por ejemplo Ácido Naftalenacético (ANA), el cual promueve el alargamiento celular, formación de callo y formación de raíces adventicias (Bhojwani y Dantu, 2013).

Quintero y col. (2003) evaluaron el efecto de distintas concentraciones de ANA (0; 0,3; 0,6 y 0,9 mg/l) sobre el enraizamiento *in vitro* de tres cultivares de ñame (Diamante 22, 003 y 005), concluyendo que concentraciones de 0,6 y 0,9 mg/l favorecieron el incremento en el número y grosor de las raíces, independientemente del cultivar.

Borges y col. (2011) optimizaron la micropropagación de *Dioscorea alata* clon caraqueño, estudiando el efecto de diferentes antioxidantes, la concentración de las sales de Murashige y Skoog y la adición de distintas combinaciones de ANA y BA. Los resultados obtenidos mostraron que las sales de MS al 75% de su concentración, el carbón activado (0,5 g/l) o la cisteína (10 mg/l), en combinación con los reguladores de crecimiento ANA/BA (0,01/0,01 mg/l) en el medio de cultivo MS, incrementaron el número de nudos

de novo (3,5), la longitud de los vástagos (4,1 cm), el número de hojas (3,8), el número de raíces (5,7) y la longitud de las raíces (6 cm).

García y col. (2004) evaluaron el efecto individual de distintas concentraciones de ANA y BA en la tuberización *in vitro* de *Dioscorea alata* var. Cartagena, reportando un incremento en el número de microtubérculos (2) y en la biomasa total (799 mg) cuando se suplementó el medio de cultivo con 5 mg/l de ANA. Mientras que el mayor número de microtubérculos (2) y biomasa total (36,5 mg) se obtuvo cuando no se añadió BA al medio de cultivo.

1.4.4 Concentración de sacarosa en el medio de cultivo

La sacarosa es probablemente la fuente de carbohidratos más comúnmente utilizada para la propagación *in vitro* de plantas. Como un agente de presión osmótica, la sacarosa puede mantener un ambiente de presión estable para el cultivo y un soporte vigoroso para el crecimiento de la mayoría de las plantas *in vitro* (Ondo Ovono y col., 2009). Algunos autores han referido un doble papel de la sacarosa en el desarrollo de los microtubérculos. Además de ser una fuente de carbono adecuada, fácilmente asimilable por las plantas *in vitro* y que se convierte en almidón en el desarrollo de los microtubérculos; la sacarosa, a una concentración de 80 g/l, también proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo de estos órganos de almacenamiento (Khuri y Moorby, 1995).

Morales (2006) menciona que la sacarosa es un inductor de varios genes en el tubérculo, tales como los de la patatina (proteína de reserva), inhibidor de proteinasas II (regulador de proteasas) y ADP-Glc pirofosforilasa. El mismo autor reporta que se han encontrado altos niveles de giberelinas (hormona inhibidora de la microtuberización) en la punta de los estolones, cuando se agrega al medio una concentración de 10 g/l de sacarosa. Estos niveles disminuyen cuando se incrementa la cantidad de sacarosa a 80 g/l, sugiriendo que este azúcar puede modular los niveles de giberelinas en los estolones y desarrollar mayor cantidad de éstos para la inducción de los microtubérculos.

Generalmente, la multiplicación de los vástagos ocurre bajo condiciones de días largos en un medio con 2-3% de sacarosa, mientras que la microtuberización es promovida por las

condiciones de día corto u oscuridad completa y elevados niveles de sacarosa (8-9 %) en el medio de cultivo (Bhojwani y Dantu, 2013).

Ondo Ovono y col. (2009) investigaron el efecto de la reducción de sacarosa en la formación, desarrollo y brotación de los microtubérculos del complejo *Dioscorea cayenensis-D. rotundata*, reportando que con la reducción de sacarosa al 1% se obtiene un porcentaje menor de formación de microtubérculos (47,4 %) en comparación al obtenido con 3% de sacarosa (100%) después de 30 días de cultivo. Además, la longitud (6,2 mm) y el peso (132 mg) de los microtubérculos obtenidos en presencia de 1% de sacarosa resultaron ser más bajos que los reportados con 3% de sacarosa (8 mm y 341 mg) a los 120 días de cultivo.

Thankappan y Abraham (2012) desarrollaron un protocolo para la micropropagación y microtuberización de *Dioscorea wallichii*, reportando que entre los niveles de sacarosa probados (1-9%), el medio MS suplementado con 8% de sacarosa resultó ser el mejor para la proliferación de los vástagos con una longitud de 11,8 cm y 9,6 nudos, después de 17 días de cultivo. Con relación a la microtuberización, la mayor cantidad de microtubérculos, de mayor diámetro (5,28 cm) y mayor peso fresco (650 mg) se obtuvo nuevamente en medios suplementados con 8% de sacarosa a los 4 meses de cultivo.

1.4.5 Fotoperiodo

La duración del día controla muchos procesos morfogénicos en las plantas, entre ellos la floración, el crecimiento de los vástagos y la tuberización (Posthumus, 2000). Se han hecho grandes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta al fotoperiodo en las plantas. Estos mecanismos incluyen la detección de la señal de luz en las hojas, la modificación de los ritmos circadianos y la producción de una señal móvil que se transmite por toda la planta (Rodríguez-Falcón y col., 2006; Jackson, 2009; Kittipadukal y col., 2012).

Según Sarkar (2010), en la mayoría de las especies tuberosas, el sitio principal de percepción de la señal fotoperiódica de tuberización está en las hojas y el fitocromo es el

pigmento responsable de captar la longitud del día en estos órganos y producir un estímulo de tuberización que viaja a los estolones para inducir la formación de los tubérculos.

Njoku (1963) reportó por primera vez que los días cortos tienden a favorecer la formación y el crecimiento de los tubérculos de ñame, mientras que los días largos favorecen el crecimiento de los vástagos.

Mantell y Hugo (1989) estudiaron el efecto del fotoperiodo sobre el desarrollo de vástagos, raíces y microtubérculos de *Dioscorea alata* y *Dioscorea bulbifera* reportando que la condición fotoperiódica de días cortos (8 horas de luz) favoreció la formación de microtubérculos en ambas especies estudiadas, alcanzando un peso individual superior a 100 mg lo cual permitió su siembra directa y posterior crecimiento de las yemas en suelos no esterilizados.

Salazar y Beltrán (2003) evaluaron el efecto del fotoperiodo, sacarosa, cinetina y ácido abscísico sobre la producción de microtubérculos de *D. alata* reportando que el mayor número de microtubérculos (235), de mayor tamaño (22,8 mm) y peso fresco (217,4 mg), se obtuvo en medios suplementados con 1 mg/l de ácido abscísico (ABA), 6% de sacarosa y bajo condiciones fotoperiódicas de días cortos (8 horas de luz).

Vaillant y col. (2005) también reportaron que el fotoperiodo afectó el crecimiento y desarrollo de las plantas de ñame (*D. alata*), debido a que la formación y desarrollo de los tubérculos fue solamente inducida bajo fotoperiodos de 12 horas de luz. Por el contrario, un fotoperiodo de 16 horas de luz inhibió la formación de los tubérculos y estimuló el crecimiento de los vástagos y de las hojas.

1.5 Bancos de germoplasma *in vitro*

El almacenamiento de semillas a bajas temperaturas y contenido de humedad constituye un método relativamente simple y eficaz para la conservación de recursos fitogenéticos. De esta manera, resulta posible conservar una gran cantidad de especies cultivadas durante largos periodos de tiempo y con un mínimo riesgo de pérdidas genéticas (erosión genética).

No obstante, existe también un número significativo de plantas de interés económico que presentan problemas a la hora de conservar sus semillas.

Con el propósito de afrontar los problemas derivados de la conservación de estos grupos de especies, en los últimos años se han desarrollado métodos alternativos a la conservación de germoplasma en bancos de semillas como la aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* para la conservación de los recursos fitogenéticos (Malaurie y col., 1993). De todas las técnicas de cultivo *in vitro*, la más utilizada para el mantenimiento de los bancos de germoplasma es la micropropagación debido a que es particularmente útil cuando las técnicas de propagación convencional no ofrecen buenos resultados o requieren material joven no disponible, y cuando se requiere una gran cantidad de material vegetal para su distribución y uso (Bhojwani y Dantu, 2013).

Para establecer los bancos de germoplasma *in vitro* se aplican métodos de micropropagación que resulten válidos para un amplio rango de accesiones dentro de una determinada especie cultivada. Así por ejemplo, en el banco de germoplasma del National Clonal Germplasm Repository (NCGR) ubicado en Corvallis, Oregón, USA, se ha desarrollado un protocolo que permite la micropropagación de 256 accesiones de frambuesa (*Rubus* spp.). También resulta interesante el desarrollo de protocolos de bajo costo como los desarrollados en la micropropagación de plátano en donde la sacarosa y el agua destilada necesarias para la elaboración del medio nutritivo han sido sustituidas por azúcar comercial y agua de chorro (Iriondo y Pita, 1998).

Según Malaurie y col. (1993), el almacenamiento *in vitro* consta básicamente de las siguientes etapas: 1) obtención del explante o material de partida de la planta madre; 2) establecimiento del cultivo *in vitro* del explante; 3) multiplicación y almacenamiento y 4) regeneración de plantas completas.

Las compañías privadas están utilizando la conservación *in vitro* para mantener híbridos propagados asexualmente que no pueden ser almacenados en forma de semilla, por ejemplo la industria del geranio utiliza como procedimiento estándar el cultivo de meristemas para

la producción de la planta madre élite, dada la elevada tasa de reinfección que sufren estas plantas, especialmente por *Xanthomonas* (Bonilla y Hernández, 2012).

1.6 Ventajas e inconvenientes de la conservación *in vitro*

La utilización de técnicas de cultivo *in vitro* en bancos de germoplasma pueden aportar grandes beneficios entre los que se encuentran 1) altas tasas de multiplicación; 2) naturaleza aséptica del cultivo donde las plantas pueden mantenerse fácilmente libres de hongos, bacterias, virus e insectos; 3) bajos requerimientos de espacio (800 cultivares con 6 réplicas por cultivar pueden almacenarse en un área de 2 m² mientras que la misma situación en una plantación en el campo requiere una hectárea; 4) posibilidad de acceder a la producción de plantas haploides; 5) el rescate de embriones inmaduros o híbridos; 6) la transformación genética para la producción de plantas modificadas; 7) la hibridación somática mediante fusión de protoplastos y 8) la producción de semilla sintética utilizando embriones somáticos (Iriondo y Pita, 1998).

No obstante, la utilidad de estas técnicas ha sido cuestionada debido a que se ha reportado que el cultivo *in vitro* altera algunas características morfológicas de las vitroplantas, tales como la composición química de la capa epicuticular, la forma y distribución de los estomas, y la estructura de las hojas y los tallos. También afecta características fisiológicas como la actividad estomática y la funcionalidad de las raíces y las hojasm por lo cual deben ser cuidadosamente tratadas durante el procedimiento de aclimatación antes de ser transferidas a campo (Brenes, 2010).

Además, otro inconveniente está relacionado con la posibilidad de inducción de alteraciones genéticas durante la conservación *in vitro*. Estas alteraciones genéticas reciben el nombre de variación somaclonal y pueden manifestarse como cambios en las secuencias de nucleótidos del ADN, en el número de cromosomas y su estructura, cambios bioquímicos o la modificación de algunas características tales como la resistencia a enfermedades o la altura de la planta. La variación somaclonal es más común en el cultivo de tejidos desorganizado como callo o cultivo de suspensiones celulares, mientras que ocurre con menor frecuencia en estructuras vegetales organizadas. Por ello, las técnicas de

conservación *in vitro* de germoplasma se basan en la utilización de meristemas preexistentes y evitan el crecimiento de callo desorganizado (Perea y Buitrago, 2000).

La utilización del explante, el ciclo de micropropagación y la concentración y tipo de reguladores de crecimiento adecuados contribuyen a minimizar la aparición de variantes somaclonales. Por ello, es importante realizar un seguimiento de las plantas regeneradas para eliminar variantes no deseadas. Unido a la simple apreciación de cambios fenotípicos, se utilizan en la actualidad técnicas bioquímicas y moleculares que detectan variaciones en isoenzimas o en la propia composición del ADN (Sánchez y Jiménez, 2010).

1.7 Bancos de germoplasma *in vitro* de ñame

Parte de la biodiversidad del género *Dioscorea* ha sido colectada para programas de mejoramiento y está actualmente preservada en bancos de germoplasma *ex situ*, con el riesgo de sufrir erosión genética debida principalmente a la presencia de enfermedades tales como Antracnosis y Mosaico del ñame y al ataque de nematodos, insectos y roedores. A estos riesgos se le suma el elevado costo de mantenimiento debido a los altos requerimientos de trabajo, 370 hasta 423 días-hombre por hectárea son necesarios para la preparación del terreno, siembra, colocación de tutores, remoción de malezas, cosecha y almacenamiento de los tubérculos. La colocación de los tutores es una operación esencial debido al rápido crecimiento vegetativo de las lianas, que pueden alcanzar hasta 30 metros de largo con más de 1000 hojas (Maurie y col., 1993).

En los bancos de germoplasma *in vitro*, las vitroplantas se desarrollan bajo condiciones generalmente controladas como la composición del medio de cultivo, el fotoperiodo, la luminosidad, la temperatura y la humedad relativa. Para el género *Dioscorea* se sugiere el uso del medio de cultivo Murashige y Skoog (1962) para micropropagar y conservar las vitroplantas de ñame. Para mantener las condiciones de crecimiento mínimo, el medio puede estar suplementado con vitaminas, 0,2 % de carbón activado, 3 % de sacarosa y solidificado con 0,8% de agar. Los explantes deben incubarse en el cuarto de crecimiento bajo un fotoperiodo de 12 a 16 h de luz, con una temperatura entre 24 a 27 °C y una intensidad lumínica de $60\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ para el cultivo de meristemas, la propagación de nudos y el enraizamiento. Para la conservación *in vitro* de las vitroplantas, debe mantenerse

una temperatura de 25 °C, humedad relativa de 70 a 80% y luminosidad directa entre 3500 y 4000 Lux con un fotoperiodo de 12 h (Borges y col., 2009a).

En el libro titulado “Normas para Bancos de Germoplasma de Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura”, publicado por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en Roma en el año 2014, aparecen citadas dos alternativas de conservación de un banco de germoplasma *in vitro*: 1) conservación a corto plazo, la cual corresponde al cultivo *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento y 2) conservación a largo plazo, mediante criopreservación del material vegetal, utilizando técnicas de encapsulamiento y deshidratación con nitrógeno líquido. Durante la conservación tanto a corto como a largo plazo, tiene que haber un control fitosanitario obligatorio de la planta madre y del material *in vitro* luego de la introducción desde condiciones de campo o invernadero.

El cultivo *in vitro* bajo condiciones de crecimiento lento, puede ser obtenido por varias vías: 1) adición de agentes osmóticos y moderadores del crecimiento, 2) baja temperatura de incubación, 3) baja concentración de minerales y sacarosa, 4) baja presión de oxígeno y 5) encapsulamiento en alginato.

Este tipo de conservación bajo condiciones de crecimiento lento es utilizada rutinariamente en bancos de germoplasma de ñame a nivel mundial, con la posibilidad de lograr la aclimatación directa del material *in vitro*, a diferencia de la técnica de conservación a largo plazo realizada con menos frecuencia debido al reporte de daños a los tejidos, originados por la formación de hielo intracelular durante las fases de enfriamiento y descongelamiento de la planta, por lo que ésta técnica todavía requiere de mejoras para ser implementada de manera habitual en los bancos de germoplasma a nivel mundial (Borges y col., 2009a).

Malaurie y col. (1998), lograron la introducción y mantenimiento de 20 especies de ñame bajo condiciones de crecimiento lento, entre las que se mencionan *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. esculenta*, *D. dumetorum*, *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. opposita*, *D. japónica*, *D. trifida*, *D. sansibarensis*, y *D. abyssinica*. Las plantas se mantuvieron en tubos

de ensayo (6 tubos de ensayo por accesión), con dos lugares diferentes de incubación para las réplicas; las condiciones de crecimiento lento permitieron mantener la mayoría de las accesiones hasta 2 años, con subcultivo cada 6 a 8 meses.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Establecimiento *in vitro* de las plantas que se utilizaron como fuente de explante para la micropropagación de los clones de ñame.

Para el establecimiento *in vitro* de las plantas de ñame se extrajeron 30 segmentos nodales de 1 cm de largo, con una o dos yemas, tomados de los clones D2, D7, D8, D13, colombiano y venezolano, cultivados en el vivero del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal. Estos segmentos nodales se desinfectaron según la metodología establecida por Royero y col. (2007), con algunas modificaciones en los tiempos de duración en cada paso (Tabla 22). Todos los lavados se hicieron dentro de la campana de flujo laminar, incluyendo un lavado con agua destilada estéril entre cada paso.

Tabla 22. Protocolo de desinfección de los segmentos nodales utilizados para el establecimiento del plantel

	Pasos				
	1	2	3	4	5
Lavados	Mezcla de agua destilada con jabón azul comercial	Alcohol al 70%	Cloro comercial al 20%	Fungicida Curacarb al 6%	Agua destilada estéril (3 lavados)
Tiempo de inmersión de los explantes	30 min	1 min	20 min	30 min	1 min cada lavado

Posteriormente, los segmentos nodales desinfectados se cultivaron en frascos de vidrio que contenía medio semisólido Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con 0,4 mg/l de tiamina, 100 mg/ml de mioinositol, 100 mg/l de cisteína, 30 g/l de sacarosa. Todo el material vegetal se incubó bajo luz blanca continua, a 25 ± 1 °C y con monitoreo frecuente durante dos meses, con el propósito de aislar rápidamente algún explante contaminado y evitar la proliferación del patógeno hacia el resto de los explantes sanos.

2.2 Micropropagación de los clones de ñame

Para evaluar el efecto de la consistencia física del medio de cultivo (semisólido y líquido) sobre la micropropagación de los clones de ñame, se extrajeron en campana de flujo laminar microesquejes de las vitroplantas de ñame, de dos meses de edad, utilizando para ello cápsulas de Petri, pinzas y bisturíes previamente esterilizados. Para el cultivo en

medio semisólido, 36 microesquejes se colocaron en 12 frascos de vidrio (tres microesquejes por frasco) sellados con papel de aluminio y Envoplast[®]. Para el cultivo en medio líquido, otros 36 microesquejes se colocaron en 12 fiolas estériles de 250 ml de capacidad (tres microesquejes por fiola), cerradas con tapones de gasa y algodón para permitir el intercambio gaseoso.

En ambos casos, el medio de cultivo que se utilizó fue el propuesto por Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con 0,4 mg/l de tiamina, 100 mg/ml de mioinositol, 100 mg/l de cisteína, 0,5 mg/l de Ácido Naftalenacético (ANA), 1 mg/l de Benciladenina (BA) y 30 g/l de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5,8 y se esterilizó en autoclave a 120 °C y 15 libras de presión por 20 minutos. Se utilizó 7 g/l de agar para el medio semisólido.

Los microesquejes cultivados, tanto en medios semisólidos como en medios líquidos, se colocaron en un cuarto de incubación con una temperatura de 25 ± 1 °C, bajo luz blanca continua ($50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), durante dos meses. El cultivo en medio líquido se mantuvo en agitación orbital a 125 rpm.

2.3 Microtuberización de los clones de ñame

Posteriormente, con el propósito de evaluar el efecto de la concentración de las sales de Murashige y Skoog (1962) y el fotoperiodo sobre la microtuberización de los clones de ñame, las vitroplantas micropropagadas se subcultivaron en medios con la formulación completa de las sales de MS y en medios con las sales reducidas a 1/5 de su concentración original, y se incubaron bajo luz blanca continua y bajo condiciones fotoperiódicas de 12 horas de luz.

Siguiendo el diseño experimental (**Figura 24**), la mitad del material cultivado en medio semisólido (18 vitroplantas) se subcultivó en medios con la formulación completa de las sales de Murashige y Skoog (MSC), mientras que la otra mitad (18 vitroplántulas) se subcultivó en medios con 1/5 de las sales de MS (1/5 MS). De igual manera se distribuyeron las vitroplantas cultivadas en medio líquido.

Seguidamente, la mitad del material vegetal que fue subcultivado en medios semisólidos y líquidos con la formulación completa de las sales de MS, se incubó bajo luz blanca continua ($50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), mientras que la otra mitad se incubó bajo 12 horas de luz. Lo mismo se hizo con las vitroplantas subcultivadas en medios semisólidos y en medios líquidos que contenían 1/5 de las sales de MS (1962). Todo esto se realizó para cada uno de los seis clones de ñame estudiados.

Las vitroplantas de ñame se incubaron nuevamente a 25 ± 1 °C durante seis meses, colocando en agitación orbital continua aquellas cultivadas en medio líquido. Cada tres semanas, se refrescaron los medios de cultivo para evitar la pérdida de vigor de las vitroplantas debido al consumo de nutrientes y a la oxidación del tejido vegetal.

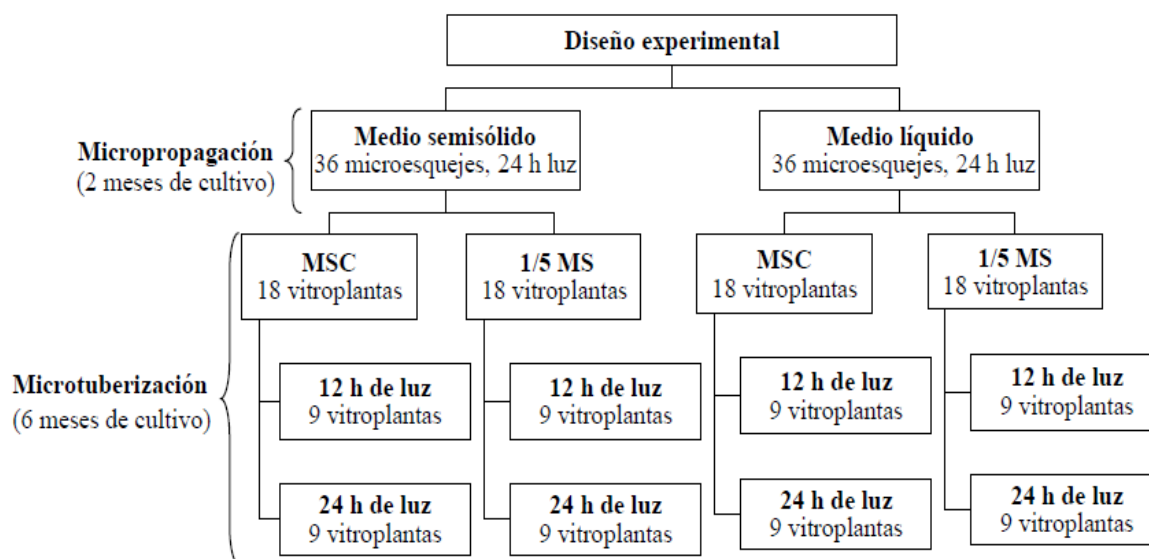


Figura 24. Diseño experimental para evaluar el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo sobre la micropropagación y microtuberización de los clones de ñame.

Una vez culminado el experimento se midieron los siguientes parámetros, para la micropropagación: número de brotes (NB), longitud de los brotes (LB), número de raíces (NR), longitud de las raíces (LR) y peso fresco de las raíces (PFR). Mientras que para la microtuberización se midieron: número de microtubérculos por planta (NM), diámetro (DM), peso fresco (PFM) y peso seco de los microtubérculos (PSM).

2.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico de datos derivados de un experimento tiene como propósito proveer información referente a la manera en que las unidades experimentales responden a los tratamientos aplicados. Con la finalidad de esclarecer este análisis, se le asignó una nomenclatura específica a cada variable y se definieron las variables dependientes e independientes para poder analizar en conjunto cómo ellas afectan la micropropagación y microtuberización de los clones de ñame estudiados (**Tabla 23**).

Tabla 23. Definición de las variables dependientes e independientes

Variables dependientes		Variables independientes					
		Clones de ñame					
		Clon D2	Clon D7	Clon D8	Clon colombiano	Clon venezolano	
		Tratamientos					
		Consistencia física del medio de cultivo		Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS)		Fotoperiodo (horas de luz)	
		Semisólido (SS)	Líquido (L)	MS Completo (MSC)	1/5 MS	24	12
Micropropagación	Número de brotes (NB)						
	Longitud de los brotes (LB)						
	Número de raíces (NR)						
	Longitud de las raíces (LR)						
	Peso fresco de las raíces (PR)						
Microtuberización	Número de microtubérculos (NM)						
	Diámetro de los microtubérculos (DM)						
	Peso fresco de los microtubérculos (PFM)						
	Peso seco de los microtubérculos(PSM)						

En la **Tabla 23** se define la interacción entre las dos variables independientes (los clones de ñame estudiados y los diferentes tratamientos aplicados para cada uno de ellos) y las variables dependientes (micropropagación, definida en 5 estados: número de brotes, longitud de los brotes, número de raíces, longitud de las raíces, peso fresco de las raíces; y microtuberización, definida en 4 estados: número, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos).

El primer paso del análisis estadístico consistió en someter los datos a un análisis de varianza (ANOVA) para establecer si existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. Esto se realizó con el programa STATISTICA versión 8.0. Si se acepta la existencia de diferencias entre los efectos de los tratamientos, es necesario conocer qué tratamiento concreto producen mayor efecto o cuáles son los tratamientos diferentes entre sí. Para ello se realizó una prueba de rangos múltiples de Tukey con un grado de confianza del 95%.

2.5 Establecimiento del banco de germoplasma *in vitro*

De los resultados obtenidos, se eligió el protocolo más eficiente para la micropropagación de los clones y se mantuvieron 20 vitroplantas de cada clon, con recambio de medio de cultivo cada dos meses, como parte del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Establecimiento *in vitro* de las plantas que se utilizaron como fuente de explante para la micropropagación de seis clones de ñame

Para lograr obtener una gran cantidad de vitroplantas de los seis clones de ñame, se tomaron 30 segmentos nodales de cada uno y se sometieron al protocolo de desinfección establecido por Royero y col. (2007). Dicho protocolo resultó ser adecuado para el establecimiento del cultivo aséptico de la mayoría de los clones de ñame, logrando obtener para cada clon más del 75% de segmentos nodales libres de contaminación (**Tabla 24**).

Tabla 24. Índices de contaminación de segmentos nodales usados como explantes

Clon	N° de explantes cultivados	Explantes sanos (%)	Explantes contaminados (%)	Explantes muertos por oxidación (%)
D2	30	79	12	9
D7	30	81	11	8
D8	30	90	6	4
D13	30	11	13	76
Venezolano	30	85	6	9
Colombiano	30	92	8	0

El clon D13 fue el único que presentó problemas durante el establecimiento del cultivo *in vitro*, debido a que la oxidación de sus tejidos fue tan severa que provocó la muerte de la mayoría de los segmentos nodales a los 5 días de haber iniciado el cultivo (**Figura 25, A y B**). Este clon también presentó el mayor porcentaje de explantes contaminados principalmente por hongos (**Figura 25, C y D**). El establecimiento *in vitro* de este clon se ha intentado reiteradas veces, siempre obteniendo los mismos resultados. Por tal motivo, las pocas vitroplantas de clon D13 que han logrado sobrevivir, se mantienen actualmente en medios de multiplicación con antioxidantes (100 mg/l de Cisteína) y antibióticos (100 mg/l de Cefotaxima), para lograr obtener un número significativo de plantas sanas que nos permitan evaluar la micropropagación y microtuberización de este clon de ñame.

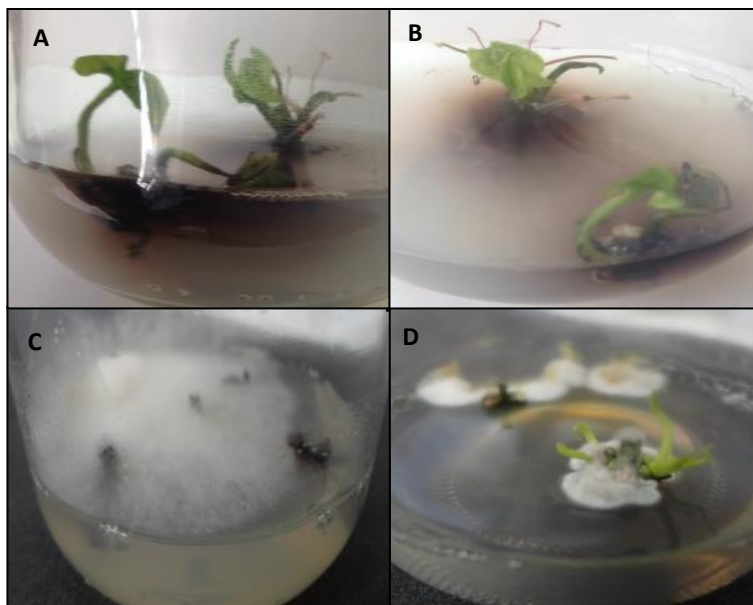


Figura 25. Segmentos nodales de clon D13, (A y B) evidencia de la oxidación de los tejidos por liberación de compuestos fenólicos y (C y D) contaminación por hongos.

Luego de permanecer un mes bajo condiciones de cultivo *in vitro*, las vitroplantas de los cinco clones de ñame desinfectados mostraron tallos vigorosos, gran cantidad hojas y algunas raíces (**Figura 26**).

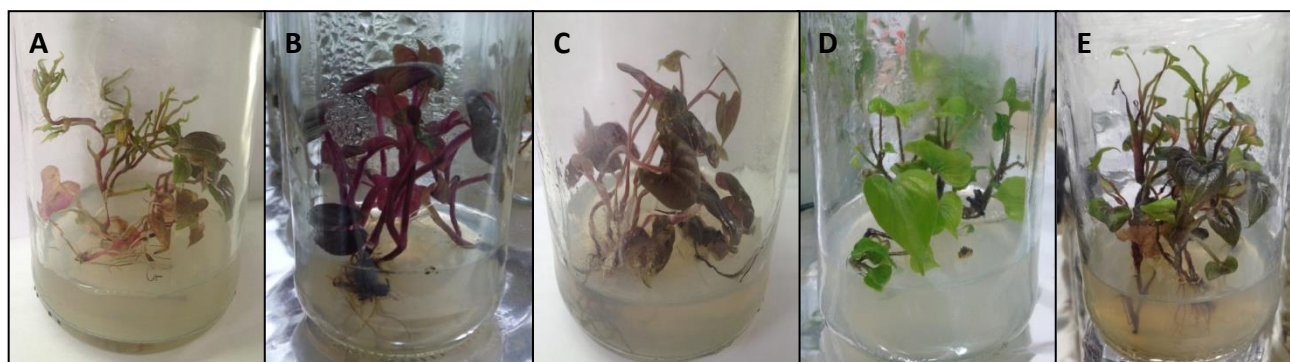


Figura 26. Clones de ñame establecidos *in vitro* luego de un mes de cultivados los segmentos nodales desinfectados: (A) clon D2, (B) clon D7, (C) clon D8, (D) clon colombiano, (E) clon venezolano.

Según Ramírez y col. (2002), las sustancias desinfectantes se utilizan para eliminar los agentes patógenos cuando los explantes se toman directamente del campo. Generalmente se utilizan protocolos económicos utilizando sustancias como el hipoclorito de sodio, el hidróxido de sodio y el alcohol, exponiendo el tejido a una concentración determinada bajo un tiempo establecido. Malaurie y col. (1993) establecieron un protocolo de desinfección de segmentos de tallo de *Dioscorea* spp. utilizando Cloruro de Mercurio (HgCl_2) al 1% como agente

desinfectante, reportando un 70% de explantes sanos. Sin embargo, este tipo de sustancias están restringidas por sus efectos tóxicos y su difícil eliminación del ambiente en donde se vierten.

Quintero y col. (2003) reportaron que la inmersión de microesquejes solo una vez en Hipoclorito de sodio al 10%, durante 10 minutos y seguido del lavado con agua destilada estéril, facilita la desinfección de los segmentos nodales de *Dioscorea* spp. Borges y col. (2009a) establecieron un protocolo de desinfección de microesquejes de *D. alata*, clon caraqueño, utilizando Hipoclorito de sodio como desinfectante, a diferentes concentraciones (1,5; 2; 2,5%) y durante distintos tiempos de inmersión (10, 20 y 30 min), reportando que con una concentración de 1,5% durante 30 minutos se obtuvo el 95% de plantas sanas con un mínimo de mortalidad del 5%.

De acuerdo con los resultados observados del proceso de desinfección establecido por Royero y col. (2007), los cuales también consideran el uso de Hipoclorito de sodio como un agente desinfectante, se puede afirmar que este compuesto químico es primordial para lograr la desinfección exitosa de los segmentos nodales de *Dioscorea*.

3.2 Micropropagación de los clones de ñame

Numerosos autores han establecido de manera exitosa la micropropagación de distintas especies de *Dioscorea* a partir de segmentos nodales con una o dos yemas (Chen y col., 2003; Kadota y Niimi, 2004; Poornima y Ravishankar, 2007; Ezeibekwe y col., 2009; Behera y col., 2010a; Borges y col., 2011; Yan y col., 2011; Thankappan y Abraham, 2012; Royero y col., 2007 y Cabrita 2014 (estas dos últimas investigaciones realizadas en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal).

En la presente investigación, se llevó a cabo la micropropagación de cinco clones de ñame a partir de segmentos nodales cultivados en medios MS semisólidos y líquidos, suplementados con dos reguladores de crecimiento (0,5 mg/l de Ácido Naftalenacético (ANA) y 1 mg/l de Benciladenina (BA)) e incubados bajo luz blanca continua, durante dos meses.

Aunque se ha reportado que la micropropagación de las especies de *Dioscorea* no requiere el suplemento del medio de cultivo con reguladores de crecimiento, algunos autores reportan que la adición principalmente de auxinas y citoquininas, mejoran los resultados y estimulan procesos tales como la proliferación de los brotes y el enraizamiento (Quintero y col., 2003; Behera y col., 2010b; Borges y col., 2011; Bhojwani y Dantu, 2013). Estos autores aseguran que cuando el medio de cultivo se suplementa con auxinas y citoquininas, el efecto sinérgico que se produce es la base para explicar una serie de procesos fisiológicos, entre ellos la regulación de la división celular.

Igualmente Shin y col. (2004) mencionan que la combinación de BA y ANA juega un papel importante en la propagación *in vitro* de segmentos nodales para inducir la multiplicación de los brotes, lo cual permite obtener un mayor número de vitroplantas a partir de un solo microesqueje.

En la primera semana de cultivo, las yemas de los cinco clones de ñame comenzaron a desarrollarse en vástagos pequeños. Una semana después, en la base de los vástagos se comenzaron a formar callos con una coloración blancuzca y de apariencia compacta, principalmente en las vitroplantas cultivadas en medios semisólidos y con menos frecuencia en aquellas cultivadas en medios líquidos (**Figura 27**).



Figura 27. Detalle de la formación de callo en las vitroplantas de (A) clon D2, (B) clon D7, (C) clon D8, (D) clon colombiano y (E) clon venezolano, a las dos semanas de haber sido cultivadas en medio semisólido, con la adición de 1 mg/l BA y 0,5 mg/l de ANA e incubadas bajo luz blanca continua.

Junto con la formación de callo, reportamos las primeras señales de oxidación en las vitroplantas de clon venezolano, clon D2, clon D7 y clon D8, cultivadas en medios semisólidos y en medios líquidos. La oxidación de los compuestos fenólicos liberados por

estas vitroplantas provocó el oscurecimiento no solo del medio de cultivo sino también de la base de los vástagos y sus raíces. Debido a esto, las vitroplantas de dichos clones fueron subcultivadas cada dos meses en medios de cultivo frescos para evitar la necrosis del sistema radical y el debilitamiento de las vitroplantas. La oxidación de los compuestos fenólicos fue mucho más pronunciada en las vitroplantas cultivadas en medio líquido, debido probablemente a la mayor difusión de oxígeno por la agitación continua del medio, requiriendo del subcultivo a medios frescos cada tres semanas (**Figura 28**).

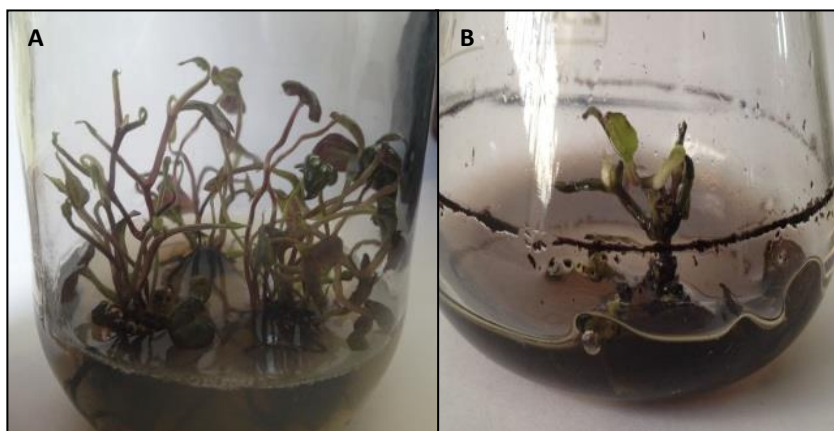


Figura 28. Vitroplantas de clon venezolano cultivadas en medio semisólido (A) y en medio líquido (B) con severos problemas de oxidación y oscurecimiento del medio de cultivo.

Un resultado muy interesante se obtuvo con las vitroplantas de clon colombiano, debido a que ellas nunca mostraron señales de oxidación, exhibiendo siempre un crecimiento más rápido y vigoroso en comparación al registrado para los otros clones, tanto en medio semisólido como en medio líquido (**Figura 29**).

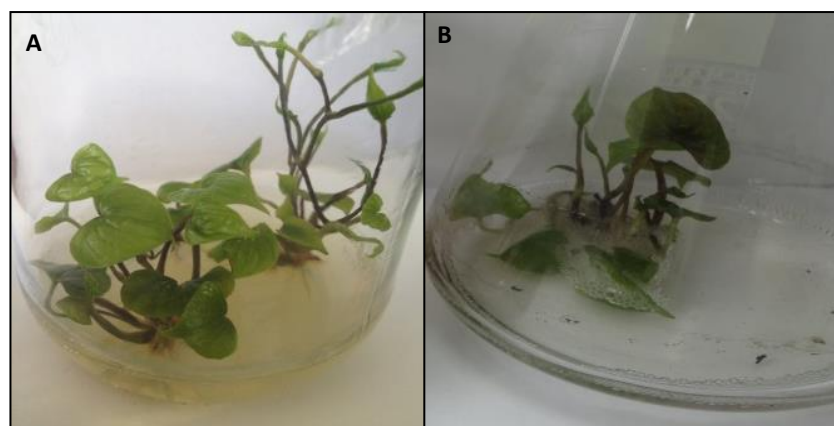


Figura 29. Vitroplantas de clon colombiano cultivadas en medio semisólido (A) y en medio líquido (B), sin señales de oxidación ni cambios de coloración en el medio de cultivo.

Quintero y Jarma (2000) diseñaron una escala para medir niveles de oxidación, designando seis valores de acuerdo con la intensidad de oxidación (oscurecimiento) del medio de cultivo alrededor del explante. Esta escala tiene valores de 0 (medios no oxidados) a 6 (medios completamente oxidados), incluidos valores del 1 al 5, los cuales hacen referencia a niveles intermedios de oxidación. Los niveles se representan en una escala con intensidades en tono gris, igualmente espaciados desde el 15% (1) hasta el 90% (6), como se muestra en la **Figura 30**.

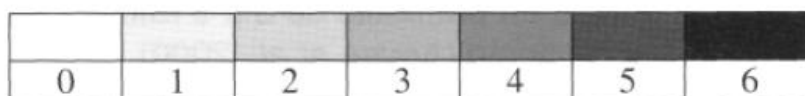


Figura 30. Escala para medir niveles de oxidación en medios de cultivo. Tomada de (Quintero y Jarma, 2000).

Basándonos en esta escala, las vitroplantas de clon venezolano, clon D2, clon D7 y clon D8 presentaron una oxidación de nivel 4 (60%). Según Quintero y col. (2003), la oxidación de sustancias de naturaleza fenólica, segregadas de algunos tejidos vegetales con alto contenido de polifenoles, impide que las células del explante sinteticen algunas proteínas, lo cual afecta la formación de estructuras y el crecimiento de las vitroplantas, razón por la cual este autor recomienda el uso de antioxidantes tales como cisteína, carbón activado o ácido ascórbico para contrarrestar los efectos negativos producidos por la liberación de los compuestos fenólicos.

Los medios en donde fueron cultivadas las vitroplantas de ñame estaban suplementados con 100 mg/l de cisteína, sin embargo, por los resultados obtenidos, este antioxidante no logró eliminar ni neutralizar los compuestos fenólicos liberados. Este resultado no coincide con lo reportado por Royero y col. (2007) quienes comentan que el éxito logrado en la fase de establecimiento del cultivo se debe a que los compuestos fenólicos fueron eliminados de manera eficiente con Cisteína. Según Borges y col. (2011), los problemas de oxidación son muy frecuentes en el cultivo de ñame, incluso en presencia de antioxidantes, y se intensifican aún más cuando se utilizan reguladores de crecimiento como auxinas y citoquininas, por lo que es de suma importancia realizar el recambio frecuente del medio de cultivo para evitar el debilitamiento y muerte de las vitroplantas.

Klu (2002) evaluó el efecto de la adición de ANA en medios Murashige y Skoog y T-medium (forma modificada de MS en la cual se omite Nitrato de amonio), sobre el crecimiento de vitroplantas y formación de microtubérculos de *Dioscorea rotundata* cv. Puna, reportando que la presencia de ANA y del Nitrato de amonio promovió la oxidación de los tejidos y el oscurecimiento del medio, siendo más pronunciada a medida que se incrementaba la concentración de esta auxina en ambos medios de cultivo.

Con base en estas publicaciones, es probable que la oxidación que sufrieron las vitroplantas de los clones venezolano, D2, D7 y D8, se haya debido a la presencia de ANA (0,5 mg/l) y BA (1 mg/l) en el medio de cultivo, que si bien favoreció la formación de callo y la multiplicación de los brotes, tuvo un efecto negativo al promover la liberación de los compuestos fenólicos tóxicos y el consecuente debilitamiento del sistema radical de estas vitroplantas.

A pesar de esto, luego de dos meses de cultivo se logró la micropropagación de los cinco clones de ñame, tanto en medio semisólido (**Figura 31**) como en medio líquido (**Figura 32**), con numerosos brotes de distintos tamaños y un sistema radical profuso.

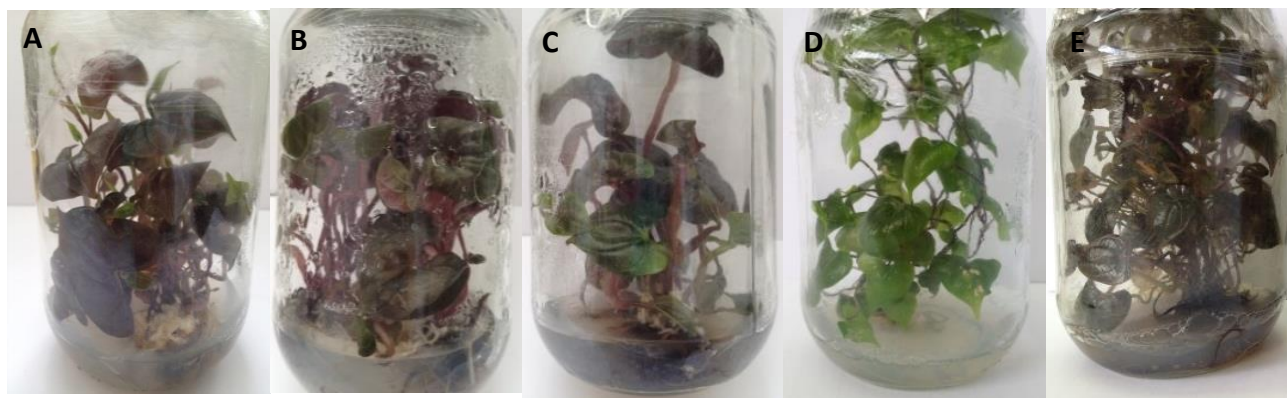


Figura 31. Vitroplantas de (A) clon D2, (B) clon D7, (C) clon D8, (D) clon colombiano y (E) clon venezolano, de dos meses de edad, micropropagadas en medio semisólido suplementado con 1 mg/l de BA y 0,5 mg/l de ANA e incubadas bajo luz blanca continua.

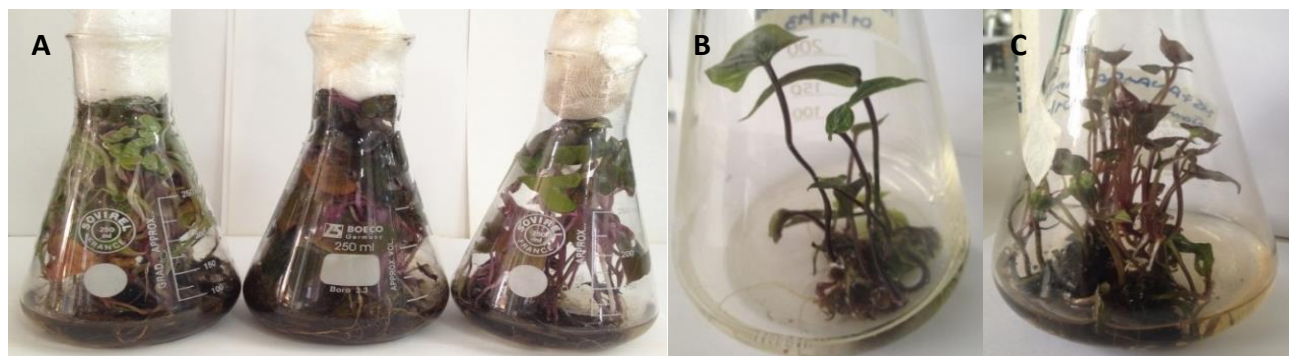


Figura 32. Vitroplantas de (A) clon D2, clon D7, clon D8, (B) clon colombiano y (C) clon venezolano, de dos meses de edad, micropropagadas en medio líquido suplementado con 1 mg/l de BA y 0,5 mg/l de ANA e incubadas bajo luz blanca continua.

La propagación del material de buena calidad es esencial para incrementar la producción sostenible del cultivo de ñame. Sin embargo, como se mencionó en la sección de antecedentes, existen numerosos factores que afectan la propagación de las plantas de ñame y la producción de microtubérculos. Es por esto que en esta investigación se establecieron distintos tratamientos en donde se evaluaron de manera sinérgica la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (1962) y el fotoperiodo, con el propósito de optimizar la micropropagación y microtuberización de cinco clones de ñame y lograr el posterior establecimiento de estos clones en un banco de germoplasma *in vitro* en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal.

A continuación se detallan los resultados obtenidos.

La **Tabla 25** muestra el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo, sobre el número promedio de brotes por explante (NB). Luego de ocho meses de cultivo, se registró el número de brotes obtenido para cada clon, en los distintos tratamientos. En general, los resultados más resaltantes de este parámetro fueron: el medio semisólido favoreció el incremento en el número de brotes para el clon venezolano, clon colombiano, clon D2 y clon D7. Por otra parte, la reducción de la concentración de las sales de MS y la incubación de las vitroplantas bajo luz blanca continua también tuvieron un efecto positivo sobre este parámetro de crecimiento, excepto para el clon venezolano.

Analizando los resultados obtenidos para cada clon, el mayor número promedio de brotes por explante (3,89) se obtuvo en las vitroplantas de clon venezolano, cultivadas en medio semisólido, con las sales completas MS y bajo condiciones fotoperiódicas de 12 horas de luz, siendo éste el mayor valor registrado, con diferencias estadísticamente significativas en comparación a lo obtenido para el resto de los clones en los distintos tratamientos.

El clon colombiano y el clon D7 obtuvieron el mayor número de brotes cuando fueron cultivados en medio semisólido, con 1/5 de las sales de MS y bajo luz blanca continua, reportando 3,78 y 3,11 brotes por explante, respectivamente, con diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos para dichos clones en los demás tratamientos. Bajo este mismo tratamiento, las vitroplantas de clon D2 lograron producir 2,78 brotes por explante, sin embargo, los resultados registrados para este clon no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Las vitroplantas del clon D8 mostraron el mayor número de brotes cuando se cultivaron en medio líquido, con 1/5 de las sales de MS y bajo luz blanca continua, registrando 2,67 brotes por explante, igualmente con diferencias estadísticamente significativas con relación a los otros valores registrados para este clon en los distintos tratamientos.

En muchos estudios relacionados con la micropropagación de las especies de *Dioscorea*, se registra la longitud de los brotes como otro parámetro de crecimiento muy importante cuando se desea optimizar las condiciones de cultivo para la propagación y conservación *in vitro* de las plantas. En la **Tabla 26** se observa el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo, sobre la longitud promedio de los brotes (LB) registrada para cada clon en los distintos tratamientos, luego de ocho meses de cultivo.

En líneas generales, se puede decir que el medio líquido y la formulación completa de las sales de MS, favorecieron la elongación de los brotes en la mayoría de los clones, excepto para el clon D2. Por otra parte, la incubación bajo luz blanca continua incrementó la longitud de los brotes en los clones D2, D7 y D8.

Analizando los resultados obtenidos para cada clon, la mayor elongación de los brotes se obtuvo en vitroplantas de clon venezolano (8,84 cm) cultivadas en medio líquido, con las sales completas de MS y bajo condiciones fotoperiódicas de 12 horas de luz, siendo éste el mayor valor registrado para este parámetro, con diferencias estadísticamente significativas, en comparación a lo obtenido para el resto de los clones en los distintos tratamientos.

En el clon D2, la mayor longitud promedio de los brotes (8,64 cm) se registró en vitroplantas cultivadas en medios semisólidos, con las sales de MS reducidas a 1/5 de su concentración original e incubadas bajo luz blanca continua, con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Las vitroplantas de clon D7 mostraron la mayor longitud promedio de sus brotes (7,33 cm) cuando se cultivaron en medio líquido, con las sales completas de MS y bajo luz blanca continua, con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Bajo estas mismas condiciones de cultivo, las vitroplantas de clon D8 lograron obtener brotes de 7,17 cm; sin embargo, los valores registrados para este clon no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Para el clon colombiano, el mejor tratamiento para lograr la mayor longitud de los brotes resultó ser el medio líquido, con las sales completas de MS y bajo condiciones fotoperiódicas de 12 horas de luz, reportando brotes con una longitud promedio de 5,75 cm, con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Tabla 25. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo sobre el número de brotes de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.

		Tratamientos							
		SS 1/5MS 24h	SS 1/5MS 12h	SS MSC 24h	SS MSC 12h	L 1/5MS 24h	L 1/5MS 12h	L MSC 24h	L MSC 12h
		$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$
Clones	CC	3,78 $\pm$ 0,46 ^{ab}	3,44 $\pm$ 0,34 ^{abc}	3,00 $\pm$ 0,44 ^{abc}	3,33 $\pm$ 0,47 ^{abc}	2,11 $\pm$ 0,51 ^{abc}	1,33 $\pm$ 0,37 ^{bc}	1,44 $\pm$ 0,41 ^{abc}	3,00 $\pm$ 0,24 ^{abc}
	CV	2,78 $\pm$ 0,32 ^{abc}	2,11 $\pm$ 0,39 ^{abc}	3,22 $\pm$ 0,46 ^{abc}	3,89 $\pm$ 0,35 ^a	1,44 $\pm$ 0,38 ^{abc}	1,44 $\pm$ 0,34 ^{abc}	1,78 $\pm$ 0,32 ^{abc}	1,56 $\pm$ 0,38 ^{abc}
	D2	2,78 $\pm$ 0,55 ^{abc}	2,67 $\pm$ 0,55 ^{abc}	2,33 $\pm$ 0,50 ^{abc}	2,00 $\pm$ 0,47 ^{abc}	1,78 $\pm$ 0,46 ^{abc}	2,67 $\pm$ 0,62 ^{abc}	2,11 $\pm$ 0,48 ^{abc}	2,78 $\pm$ 0,52 ^{abc}
	D7	3,11 $\pm$ 0,56 ^{abc}	1,56 $\pm$ 0,47 ^{abc}	2,00 $\pm$ 0,55 ^{abc}	2,11 $\pm$ 0,59 ^{abc}	2,11 $\pm$ 0,48 ^{abc}	1,33 $\pm$ 0,37 ^{bc}	1,67 $\pm$ 0,37 ^{abc}	1,78 $\pm$ 0,49 ^{abc}
	D8	1,89 $\pm$ 0,42 ^{abc}	1,56 $\pm$ 0,44 ^{abc}	1,67 $\pm$ 0,41 ^{abc}	1,56 $\pm$ 0,47 ^{abc}	2,67 $\pm$ 0,58 ^{abc}	1,78 $\pm$ 0,52 ^{abc}	2,56 $\pm$ 0,71 ^{abc}	1,22 $\pm$ 0,36 ^c

Consistencia del medio de cultivo: semisólido (SS) o líquido (L). Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC) o 1/5 de las sales de MS (1/5 MS). Fotoperiodo: 24 horas de luz o 12 horas de luz. La tabla indica el promedio ($\bar{X}$) y el error estándar (ES) del número de brotes de cada clon en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores ($\alpha=0,5$), el cual indicó la existencia de diferencias significativas entre los clones ($p<0,05$. Factor 1) y entre tratamientos ($p<0,05$. Factor 2). Las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabla 26. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo sobre la longitud de los brotes (en centímetros) de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.

		Tratamientos							
		SS 1/5MS 24h	SS 1/5MS 12h	SS MSC 24h	SS MSC 12h	L 1/5MS 24h	L 1/5MS 12h	L MSC 24h	L MSC 12h
		$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$
Clones	CC	5,21 $\pm$ 0,25 ^{bc}	5,16 $\pm$ 0,28 ^{bc}	4,31 $\pm$ 0,33 ^c	5,12 $\pm$ 0,28 ^{bc}	4,11 $\pm$ 0,46 ^c	3,66 $\pm$ 0,63 ^c	3,76 $\pm$ 0,61 ^c	5,75 $\pm$ 0,45 ^{bc}
	CV	6,85 $\pm$ 0,48 ^{abc}	7,13 $\pm$ 0,86 ^{abc}	8,76 $\pm$ 0,52 ^{a,b}	8,78 $\pm$ 0,45 ^{a,b}	7,45 $\pm$ 0,88 ^{abc}	6,42 $\pm$ 0,84 ^{abc}	8,06 $\pm$ 0,71 ^{abc}	8,84 $\pm$ 0,82 ^a
	D2	8,64 $\pm$ 0,76 ^{ab}	6,38 $\pm$ 0,84 ^{abc}	8,00 $\pm$ 0,66 ^{abc}	4,38 $\pm$ 0,57 ^{bc}	5,08 $\pm$ 0,61 ^{bc}	8,22 $\pm$ 0,63 ^{abc}	8,00 $\pm$ 0,68 ^{abc}	4,97 $\pm$ 0,33 ^{bc}
	D7	5,79 $\pm$ 0,68 ^{bc}	7,20 $\pm$ 0,90 ^{abc}	6,04 $\pm$ 0,67 ^{abc}	6,45 $\pm$ 0,72 ^{abc}	4,63 $\pm$ 0,43 ^{bc}	4,95 $\pm$ 0,80 ^{bc}	7,33 $\pm$ 0,73 ^{abc}	3,69 $\pm$ 0,51 ^c
	D8	6,79 $\pm$ 0,79 ^{abc}	6,49 $\pm$ 0,89 ^{abc}	5,50 $\pm$ 0,62 ^{abc}	5,46 $\pm$ 0,91 ^{abc}	7,06 $\pm$ 0,52 ^{abc}	6,04 $\pm$ 0,70 ^{abc}	7,17 $\pm$ 0,76 ^{abc}	6,33 $\pm$ 1,29 ^{abc}

Consistencia del medio de cultivo: semisólido (SS) o líquido (L). Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC) o 1/5 de las sales de MS (1/5 MS). Fotoperiodo: 24 horas de luz o 12 horas de luz. La tabla indica el promedio ($\bar{X}$) y el error estándar (ES) de la longitud de los brotes de cada clon en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores ($\alpha=0,5$), el cual indicó la existencia de diferencias significativas entre los clones ($p<0,05$. Factor 1) y entre tratamientos ($p<0,05$. Factor 2). Las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba *a posteriori* de Tukey ($\alpha=0,05$).

Se ha reportado que las vitroplantas de ñame pueden ser inducidas a la multiplicación de sus brotes tanto en medios semisólidos (Royero y col., 2007; Behera y col. 2010a; Borges y col., 2011) como en medios líquidos (Cabrera y col. 2001; Balogun y col., 2014; Polzin y col., 2014), en ambos casos con excelentes resultados. En esta investigación, el mayor número de brotes se obtuvo en medios semisólidos, debido probablemente a que en ellos la formación de callo fue mucho más abundante, favoreciendo una mayor proliferación de los brotes en comparación a la registrada para medios líquidos, en donde la formación de callo fue escasa. Este resultado coincide con lo publicado por Royero y col. (2007), quienes optimizaron la micropropagación de *D. alata*, reportando que el mayor número de brotes promedio por explante (5,15) se obtuvo en vitroplantas cultivadas en medios semisólidos suplementados con 0,5 mg/l de ANA y 1 mg/l de BA.

En algunas investigaciones se ha reportado que la formación de callo no siempre es ventajosa, debido a que induce variabilidad genética en ciertos cultivos. Sin embargo, Marín y col. (2012) evaluaron la variabilidad genética de vitroplantas de *Dioscorea alata* mediante un análisis de Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (RAPD), reportando un 0,12% de polimorfismo, lo que quiere decir que las vitroplantas obtenidas mediante la formación de callo o de manera directa, fueron prácticamente idénticas a la planta madre.

De los resultados obtenidos, también se pudo observar que la consistencia física del medio de cultivo juega un papel importante sobre la elongación de los brotes de los clones de ñame. Algunos autores han reportado que el medio de cultivo líquido favorece el crecimiento de las vitroplantas, debido al contacto directo con los nutrientes disueltos y al eficiente intercambio gaseoso que se da gracias al uso de tapones elaborados con gasa y algodón (Kadota y Niimi, 2004; George y col., 2008; Bhojwani y Dantu, 2013). En la presente investigación, las vitroplantas de los clones D7, D8, colombiano y venezolano, mostraron la mayor longitud de sus brotes cuando se cultivaron en medios líquidos, corroborando lo reportado por dichos autores. Estos resultados también coinciden con lo publicado por Yan y col. (2011), quienes evaluaron la micropropagación de *Dioscorea fordii*, reportando que la longitud de los vástagos fue significativamente mayor en medio líquido (3,6 cm) comparado con el medio semisólido (1,6 cm).

Por otra parte, analizando el efecto que tuvo la concentración de las sales de MS sobre el número y la longitud de los brotes de los clones de ñame, Murashige (1982) planteó que el manejo de la concentración de las sales minerales es ampliamente recomendado para estimular la formación de yemas y hojas, la elongación de los vástagos producidos *in vitro* y el enraizamiento. En nuestra investigación, la formulación completa de las sales de MS favoreció la elongación de los vástagos en cuatro de los cinco clones estudiados, pero una reducción de la concentración de las sales favoreció el incremento en el número de brotes.

Esta reportado que la reducción de las sales, tanto en el suelo como en el medio de cultivo, genera condiciones de estrés en las planta debido a la falta de nutrientes (González, 2012). Con base en esta afirmación, se puede inferir en que bajo condiciones de estrés, la multiplicación de los brotes aumenta como respuesta de supervivencia, pero al tener los nutrientes tan limitados, la elongación de los vástagos se reduce considerablemente. En oposición a estos resultados, Royero y col. (2007) reportaron que el mayor número de brotes de *D. alata* (4,90) se obtuvo en medios con la formulación completa de las sales de MS, disminuyendo a 1,07 cuando las vitroplantas se cultivaron en medios con 1/5 de las sales de MS.

Borges y col. (2011) mencionan que no siempre la reducción de las sales es ideal para inducir algunos procesos tales como la multiplicación de los brotes. Ellos demostraron que una reducción de las sales de MS, por debajo del 75% de su concentración original, trae efectos perjudiciales en la formación de nuevos brotes y en la elongación de los vástagos, reportando 1,6 brotes por explante de 1,3 cm con las sales de MS reducidas al 20% (1/5), mientras que con las sales de MS al 75%, este valor incrementó a 2,8 brotes por explante de 3 cm.

Con relación al efecto que tuvo el fotoperiodo sobre el número de brotes y la elongación de los mismos, se puede afirmar que la incubación bajo luz blanca continua favorece la multiplicación y la elongación de los brotes de la mayoría de los clones estudiados, siendo el clon venezolano el único que mostró los mayores valores de número y longitud de los brotes bajo 12 horas de luz.

En la mayoría de las investigaciones en donde se evalúa el efecto del fotoperiodo sobre la micropropagación y microtuberización de las especies vegetales, se concluye que los días largos favorecen el crecimiento de la parte aérea de la planta, la proliferación y la elongación de los vástagos y el aumento del área foliar, mientras que los días cortos promueven la formación de microtubérculos (Mantell y Hugo, 1989; Posthumus, 2000; Salazar y Beltrán, 2003; Vaillant y col., 2005; Rodríguez-Falcón y col., 2006; Kittipadukal y col., 2012).

Los protocolos para optimizar la micropropagación de cualquier especie vegetal no sólo buscan obtener un gran número de brotes con numerosas hojas, también es indispensable lograr que las vitroplantas desarrollen un sistema radical profuso que les permita sobrevivir a las condiciones de invernadero durante la etapa de aclimatación. En este sentido, en la presente investigación se midieron tres parámetros que nos permiten evaluar el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo, sobre el enraizamiento de las vitroplantas de los cinco clones de ñame. A continuación se mencionan los resultados obtenidos.

El crecimiento de las primeras raíces de las vitroplantas de ñame se evidenció a las dos semanas de cultivo, en medios semisólidos y líquidos suplementados con 0,5 mg/l de ANA y 1 mg/l de BA y bajo luz blanca continua. Estas raíces eran de color blancuzco pero por los problemas de oxidación comentados anteriormente, tendían a tornarse de color marrón. Afortunadamente, a los dos meses de cultivo y con el recambio frecuente del medio, se logró el enraizamiento de las vitroplantas de los cinco clones de ñame.

La **Tabla 27** muestra el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo, sobre el número promedio de raíces por explante (NR). Luego de ocho meses de cultivo, se registró el número de raíces obtenido para cada clon, en los distintos tratamientos. La heterogeneidad de los resultados obtenidos para este parámetro de crecimiento dificulta hacer un análisis general de cuáles fueron las mejores condiciones de cultivo para los cinco clones, debido a que no hay una consistencia física del medio de cultivo, una concentración de las sales o una condición fotoperiodica

que haya sido favorecedora para la mayoría de los clones de ñame. Por esta razón, el análisis de los resultados se hizo únicamente de manera individual para cada uno de los clones.

El mayor número promedio de raíces por explante (6,67) se obtuvo en vitroplantas de clon colombiano cultivadas en medios semisólidos, con 1/5 de las sales de MS e incubadas bajo luz blanca continua, siendo éste el mayor valor registrado para este parámetro, con diferencias estadísticamente significativas, en comparación a lo obtenido para el resto de los clones en los distintos tratamientos.

El clon venezolano obtuvo el mayor número promedio de raíces por explante (3,11) cuando las vitroplantas se cultivaron en medio líquido, con las sales completas de MS y bajo luz blanca continua. Bajo estas mismas condiciones de cultivo, variando únicamente el fotoperiodo a 12 horas de luz, también se obtuvo el mayor número de raíces por explante (3,67) para el clon D8.

El clon D2 y el clon D7 mostraron resultados muy ambiguos, reportando incluso el mismo número de raíces (3,00 y 3,33; respectivamente) en tratamientos completamente distintos, con diferencias estadísticamente significativas sólo para el clon D7.

El número de raíces juega un papel fundamental para lograr la aclimatación de las vitroplantas; sin embargo, no es el único parámetro que se debe considerar puesto que la longitud del sistema radical también es de suma importancia. Bhojwani y Dantu (2013) comentan que raíces muy pequeñas (menores a 1 cm de longitud) tienden a morir deshidratadas cuando las vitroplantas son transferidas a la etapa de aclimatación, mientras que una vitroplanta con numerosas raíces, mayores a 5 cm de longitud, puede tolerar los cambios relacionados con las características del suelo y sobrevivir en un ambiente no estéril.

En este sentido, se decidió evaluar el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo sobre la longitud promedio de las raíces (LR) de los cinco clones de ñame (**Tabla 28**).

El análisis estadístico de los datos obtenidos para este parámetro de crecimiento mostró que no existen diferencias significativas entre los clones ni tratamientos, lo que quiere decir que ninguna de las combinaciones de los factores evaluados tuvo efecto sobre la longitud de las raíces de clones de ñame. Sin embargo, se puede inferir que el medio semisólido favoreció la elongación de las raíces, excepto para el clon colombiano, mientras que la formulación completa de las sales de MS y las condiciones fotoperiódicas de 12 horas de luz tuvieron un efecto positivo, excepto para el clon venezolano y el clon D2.

La **Tabla 29** muestra el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo, sobre el peso fresco de las raíces por explante (PFR). Los resultados muestran que el medio líquido favoreció el incremento del peso fresco de las raíces, excepto en el clon D2. Por otra parte, la reducción de la concentración de las sales de MS arrojó mejores resultados, excepto para el clon venezolano, y la incubación bajo luz blanca continua incrementó el peso fresco de las raíces de los clones de ñame, excepto para el clon colombiano y el clon D7.

Analizando los resultados de manera individual, el mayor peso fresco de las raíces (2,47g) se obtuvo en vitroplantas de clon colombiano cultivadas en medio líquido, con 1/5 de las sales de MS e incubadas bajo 12 horas de luz, siendo éste el mejor resultado registrado para este parámetro, con diferencias estadísticamente significativas, en comparación a lo obtenido para el resto de los clones en los distintos tratamientos. Bajo estas mismas condiciones de cultivo, también se obtuvo el mayor peso fresco de las raíces (2,29 g) en las vitroplantas de clon D7, con diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

Las vitroplantas de clon venezolano obtuvieron el mayor peso fresco de sus raíces (2,02 g) cuando fueron cultivadas en medios líquidos, con las sales completas de MS e incubadas bajo luz blanca continua, con diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Por último, el clon D8 mostró el mismo resultado (2,33 g) en dos tratamientos similares, variando únicamente la concentración de las sales de MS.

Tabla 27. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el número de raíces de las vitroplantas de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.

		Tratamientos							
		SS 1/5MS 24h	SS 1/5MS 12h	SS MSC 24h	SS MSC 12h	L 1/5MS 24h	L 1/5MS 12h	L MSC 24h	L MSC 12h
		$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$
Clones	CC	6,67 $\pm$ 0,41 ^a	5,22 $\pm$ 0,46 ^a	4,44 $\pm$ 0,65 ^{ab}	4,00 $\pm$ 0,50 ^{ab}	3,33 $\pm$ 0,41 ^{abc}	3,89 $\pm$ 0,45 ^{abc}	1,89 $\pm$ 0,35 ^c	3,11 $\pm$ 0,26 ^{bc}
	CV	2,67 $\pm$ 0,29 ^{bc}	2,89 $\pm$ 0,31 ^{bc}	2,44 $\pm$ 0,24 ^{bc}	2,78 $\pm$ 0,22 ^{bc}	2,89 $\pm$ 0,26 ^{bc}	1,78 $\pm$ 0,28 ^c	3,11 $\pm$ 0,42 ^{bc}	2,67 $\pm$ 0,29 ^{bc}
	D2	2,89 $\pm$ 0,31 ^{bc}	2,22 $\pm$ 0,28 ^{bc}	3,00 $\pm$ 0,47 ^{bc}	2,89 $\pm$ 0,26 ^{bc}	3,00 $\pm$ 0,41 ^{bc}	3,11 $\pm$ 0,31 ^{bc}	2,22 $\pm$ 0,32 ^{bc}	3,00 $\pm$ 0,37 ^{bc}
	D7	2,89 $\pm$ 0,26 ^{bc}	3,33 $\pm$ 0,50 ^{abc}	2,89 $\pm$ 0,54 ^{bc}	2,44 $\pm$ 0,34 ^{bc}	2,67 $\pm$ 0,37 ^{bc}	3,11 $\pm$ 0,45 ^{bc}	3,33 $\pm$ 0,41 ^{abc}	3,11 $\pm$ 0,42 ^{bc}
	D8	2,67 $\pm$ 0,33 ^{bc}	2,89 $\pm$ 0,26 ^{bc}	2,67 $\pm$ 0,37 ^{bc}	3,44 $\pm$ 0,41 ^{abc}	2,44 $\pm$ 0,38 ^{bc}	3,33 $\pm$ 0,29 ^{abc}	3,56 $\pm$ 0,34 ^{abc}	3,67 $\pm$ 0,29 ^{abc}

Consistencia del medio de cultivo: semisólido (SS) o líquido (L). Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC) o 1/5 de las sales de MS (1/5 MS). Fotoperiodo: 24 horas de luz o 12 horas de luz. La tabla indica el promedio ($\bar{X}$) y el error estándar (ES) del número de raíces de cada clon en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores ($\alpha=0,5$), el cual indicó la existencia de diferencias significativas entre los clones ($p<0,05$. Factor 1) y entre tratamientos ($p<0,05$. Factor 2). Las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba a *posteriori* de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabla 28. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre la longitud de las raíces (en centímetros) de las vitroplantas de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.

		Tratamientos							
		SS 1/5MS 24h	SS 1/5MS 12h	SS MSC 24h	SS MSC 12h	L 1/5MS 24h	L 1/5MS 12h	L MSC 24h	L MSC 12h
		$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$
Clones	CC	7,27 $\pm$ 0,33 ⁻	6,55 $\pm$ 0,33 ⁻	6,44 $\pm$ 0,37 ⁻	6,53 $\pm$ 0,45 ⁻	6,64 $\pm$ 0,45 ⁻	6,29 $\pm$ 0,44 ⁻	7,52 $\pm$ 0,55 ⁻	8,03 $\pm$ 0,55 ⁻
	CV	8,97 $\pm$ 0,68 ⁻	6,88 $\pm$ 0,62 ⁻	7,88 $\pm$ 0,49 ⁻	7,90 $\pm$ 0,66 ⁻	7,77 $\pm$ 0,62 ⁻	7,69 $\pm$ 0,59 ⁻	8,81 $\pm$ 0,60 ⁻	8,73 $\pm$ 0,65 ⁻
	D2	8,86 $\pm$ 0,63 ⁻	6,91 $\pm$ 0,53 ⁻	6,89 $\pm$ 0,44 ⁻	6,73 $\pm$ 0,47 ⁻	7,94 $\pm$ 0,75 ⁻	7,36 $\pm$ 0,55 ⁻	7,21 $\pm$ 0,68 ⁻	8,42 $\pm$ 0,59 ⁻
	D7	7,17 $\pm$ 0,38 ⁻	6,82 $\pm$ 0,42 ⁻	7,38 $\pm$ 0,50 ⁻	7,40 $\pm$ 0,50 ⁻	6,52 $\pm$ 0,51 ⁻	7,35 $\pm$ 0,54 ⁻	6,76 $\pm$ 0,43 ⁻	7,04 $\pm$ 0,57 ⁻
	D8	7,46 $\pm$ 0,55 ⁻	7,17 $\pm$ 0,49 ⁻	6,26 $\pm$ 0,57 ⁻	8,07 $\pm$ 0,54 ⁻	6,96 $\pm$ 0,67 ⁻	7,31 $\pm$ 0,53 ⁻	7,91 $\pm$ 0,55 ⁻	7,17 $\pm$ 0,52 ⁻

Consistencia del medio de cultivo: semisólido (SS) o líquido (L). Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC) o 1/5 de las sales de MS (1/5 MS). Fotoperiodo: 24 horas de luz o 12 horas de luz. La tabla indica el promedio ($\bar{X}$) y el error estándar (ES) de la longitud de las raíces para cada clon en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores ($\alpha=0,5$). El cual indicó que no existen diferencias significativas entre los clones ($p>0,05$. Factor 1) y entre tratamientos ($p>0,05$. Factor 2).

Tabla 29. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el peso fresco de las raíces (en gramos) de las vitroplantas de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.

		Tratamientos							
		SS 1/5MS 24h	SS 1/5MS 12h	SS MSC 24h	SS MSC 12h	L 1/5MS 24h	L 1/5MS 12h	L MSC 24h	L MSC 12h
		$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$
Clones	CC	1,98 $\pm$ 0,31 ^{abc}	1,93 $\pm$ 0,22 ^{abc}	1,96 $\pm$ 0,23 ^{abc}	2,34 $\pm$ 0,18 ^{ab}	2,21 $\pm$ 0,21 ^{ab}	2,47 $\pm$ 0,17 ^a	0,82 $\pm$ 0,13 ^c	2,20 $\pm$ 0,16 ^{ab}
	CV	1,28 $\pm$ 0,20 ^{bc}	1,34 $\pm$ 0,22 ^{bc}	1,04 $\pm$ 0,14 ^c	1,36 $\pm$ 0,08 ^{bc}	1,92 $\pm$ 0,09 ^{abc}	1,46 $\pm$ 0,12 ^{abc}	2,02 $\pm$ 0,21 ^{abc}	1,31 $\pm$ 0,14 ^{bc}
	D2	2,34 $\pm$ 0,15 ^{ab}	1,56 $\pm$ 0,18 ^{abc}	2,04 $\pm$ 0,20 ^{abc}	2,14 $\pm$ 0,23 ^{ab}	2,06 $\pm$ 0,16 ^{abc}	1,50 $\pm$ 0,20 ^{abc}	1,97 $\pm$ 0,13 ^{abc}	1,89 $\pm$ 0,23 ^{abc}
	D7	1,91 $\pm$ 0,20 ^{abc}	2,03 $\pm$ 0,26 ^{abc}	1,46 $\pm$ 0,13 ^{abc}	1,48 $\pm$ 0,20 ^{abc}	1,74 $\pm$ 0,18 ^{abc}	2,29 $\pm$ 0,17 ^{ab}	1,86 $\pm$ 0,19 ^{abc}	1,73 $\pm$ 0,19 ^{abc}
	D8	2,13 $\pm$ 0,13 ^{ab}	1,47 $\pm$ 0,18 ^{abc}	1,60 $\pm$ 0,20 ^{abc}	1,94 $\pm$ 0,25 ^{abc}	2,33 $\pm$ 0,23 ^{ab}	1,94 $\pm$ 0,16 ^{abc}	2,33 $\pm$ 0,23 ^{ab}	1,89 $\pm$ 0,23 ^{abc}

Consistencia del medio de cultivo: semisólido (SS) o líquido (L). Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC) o 1/5 de las sales de MS (1/5 MS). Fotoperiodo: 24 horas de luz o 12 horas de luz. La tabla indica el promedio ($\bar{X}$) y el error estándar (ES) del peso fresco de las raíces de cada clon en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores ($\alpha=0,5$), el cual indicó la existencia de diferencias significativas entre los clones ($p<0,05$. Factor 1) y entre tratamientos ($p<0,05$. Factor 2). Las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba a *posteriori* de Tukey ($\alpha=0,05$).

Los resultados obtenidos del efecto de la consistencia física del medio de cultivo sobre el número de raíces de las vitroplantas de ñame, coinciden con lo publicado por Kadota y Niimi (2004) quienes optimizaron la micropropagación de *Dioscorea japónica*, reportando que el medio líquido favoreció el incremento en el número de raíces (9,8), en comparación al medio semisólido (3,9). Sin embargo, estos mismos autores reportaron que la mayor elongación de los brotes se obtuvo en medio semisólido (7,45 cm) y no en medios líquidos (5,30 cm). En nuestra investigación, la longitud de las raíces de los clones de ñame no parece haber estado influenciada por ninguno de los factores estudiados; sin embargo, si revisamos cuáles fueron los mayores valores obtenidos para cada clon y bajo qué consistencia física del medio de cultivo se obtuvieron, nuestros resultados serían similares a los obtenidos por Kadota y Niimi, (2004) para este parámetro.

Existe poca información acerca de cómo afecta la consistencia física del medio de cultivo el peso fresco de las raíces. Se sabe que tanto en medios líquidos como en medios semisólidos, el tejido radical se encuentra en contacto directo con los nutrientes presentes en el medio; sin embargo, en los medios semisólidos dichos nutrientes están atrapados en una red gelatinosa, lo cual dificulta un poco más su absorción en comparación al medio líquido, en donde los nutrientes disueltos difunden con mayor facilidad al tejido radical. Quizás esto explique el incremento del peso fresco en vitroplantas cultivadas en medios líquidos en comparación al obtenido en medios semisólidos.

El segundo factor que afectó el enraizamiento de los clones de ñame fue la concentración de las sales de MS. Algunas veces, para inducir la formación de raíces, las vitroplantas son transferidas a medios de cultivo con la concentración de las sales de MS reducidas a la mitad o a 1/5. Por ejemplo, Royero y col. (2007) obtuvieron el mayor número promedio de raíces por explante (7,15) en vitroplantas de *D. alata*, cultivadas en medios con 1/5 de las sales de MS y suplementados con 0,2 mg/l de ANA y 0,2 mg/l de BA. Quizás el efecto positivo de reducir la concentración de las sales en el medio de cultivo se deba al consecuente aumento del potencial osmótico, lo cual favorece la absorción de agua y nutrientes. En el campo, la alta concentración de sales en la solución del suelo

disminuye el potencial osmótico, lo cual ocasiona que el tejido radical pierda agua en respuesta al gradiente de concentración generado por la diferencia de concentraciones, afectando la absorción y el crecimiento de las raíces y en consecuencia provocando el debilitamiento de la planta (Segovia 1987). En este sentido, reducir la concentración de las sales en el suelo evita graves problemas tales como deshidratación de la planta, retraso en su desarrollo y toxicidad por iones específicos, favoreciendo el crecimiento del sistema radical y la absorción de agua y nutrientes.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestra investigación, la reducción de las sales de MS (a 1/5 de su concentración original) no favoreció el incremento en el número de raíces ni su elongación en la mayoría de los clones, de hecho solamente el clon colombiano obtuvo el mayor número promedio de raíces por explante cuando se cultivó en medios con 1/5 de las sales de MS y sólo el clon venezolano y el clon D2 mostraron la mayor longitud de sus raíces bajo esta misma condición.

Piqueras y Debergh (2000) señalaron que la reducción de las sales de MS por debajo del 25% de la formulación original, puede afectar la morfología de las plantas micropropagadas debido a cambios en la presión osmótica, lo cual afecta principalmente el desarrollo de las raíces *in vitro*. Al respecto, Borges y col. (2011) optimizaron un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *D. alata* evaluando distintas concentraciones de las sales de MS (20, 50, 75 y 100%). Ellos observaron que el mayor número de raíces (5,7) y la mayor longitud (6,0 cm) se obtuvo en vitroplantas cultivadas en medio semisólido, con las sales de MS al 75% y suplementado con 0,01 mg/l de ANA y 0,01 mg/l de BA, mientras que la reducción de las sales al 20% (1/5) fue perjudicial para el desarrollo de las raíces. En este sentido, para futuras investigaciones se recomienda evaluar el efecto de la reducción de las sales a un 75% de su concentración, sobre el enraizamiento de los clones de ñame.

Para el peso fresco de las raíces, la reducción de las sales sí parece haber tenido un efecto positivo. Son pocos los estudios que se han realizado con relación al efecto de la concentración de las sales de MS sobre el peso fresco, pero quizás los resultados obtenidos puedan explicarse retomando lo comentado anteriormente: si la reducción de las sales de

MS aumenta el potencial osmótico, las raíces pueden absorber agua con mayor facilidad, lo cual se refleja en el incremento de su peso fresco.

Finalmente, para discutir el efecto del fotoperiodo sobre el enraizamiento de los clones de ñame, es importante recordar que algunos fenómenos propios del desarrollo de las plantas (germinación, floración, tuberización) son regulados por el número de horas diarias de luz que ellas reciben. De manera análoga, el número de horas luz que recibe el explante cultivado *in vitro* puede variar sus patrones normales de desarrollo e inducir otros procesos tales como la elongación de los vástagos, el incremento en el área foliar y la microtuberización. Aunque existen numerosos trabajos en donde se ha estudiado el efecto del fotoperiodo sobre el crecimiento y tuberización *in vitro* de la plantas de ñame, ninguno de ellos expone de qué manera la variación de las horas del día afecta el enraizamiento de las plantas. En consecuencia, los resultados obtenidos en esta investigación no pueden ser comparados con otras publicaciones pero se puede decir que coinciden con la teoría de que el fotoperiodo de días largos favorece el desarrollo de un sistema radical profuso, así como también el desarrollo de la parte aérea de la planta.

3.3 Microtuberización de los clones de ñame

Como vimos en la sección anterior, la micropropagación de las plantas de ñame resulta ser una excelente alternativa para obtener un gran número de plantas sanas, en corto tiempo y en espacios reducidos. Sin embargo, algunos investigadores han reportado ciertos inconvenientes al momento de trasladar las vitroplantas a condiciones de invernadero. Entre ellos se mencionan: muerte por desecación, ineficiencia del sistema fotosintético, malformación de hojas y raíces, ataque de patógenos, etc. Por esta razón, algunas veces el proceso de aclimatación requiere de mano de obra calificada que sepa manipular cuidadosamente las vitroplantas, encareciendo los costos del proceso de micropropagación.

Para superar estas limitaciones, en los últimos años se han desarrollado protocolos que permiten inducir la formación de tubérculos bajo condiciones *in vitro*, también llamados microtubérculos. Estos microtubérculos, al ser originados bajo condiciones de esterilidad, pueden ser utilizados como semillas libres de patógenos y pueden ser sembrados

directamente en campo sin necesidad de pasar por una etapa de aclimatación, debido a que son mucho más resistentes a la manipulación durante el traslado y siembra, en comparación a las vitroplantas. Además, son mucho más pequeños que los tubérculos convencionales obtenidos en campo, por lo que pueden ser trasladados fácilmente en cualquier recipiente, sin necesidad de utilizar medios de cultivo o mantener una temperatura y una condición lumínica específica para mantener su viabilidad.

En este sentido, en esta investigación se evaluó el efecto de la consistencia del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo sobre la microtuberización de cinco clones de ñame, registrando el número, diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos obtenidos para cada clon. A continuación se discuten los resultados obtenidos.

La **Tabla 30** muestra el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo sobre el número de los microtubérculos (NM), registrado para cada clon en los distintos tratamientos, luego de ocho meses de cultivo. El resultado más destacado para este parámetro fue el efecto que tuvo la consistencia física del medio de cultivo sobre la microtuberización de las plantas de ñame. Únicamente el clon colombiano produjo microtubérculos en medio semisólido y bajo unas condiciones de cultivo específicas: las sales completas MS y fotoperiodo de 12 horas de luz, reportando 1,33 microtubérculos/explante (**Figura 33**). Los otros cuatro clones produjeron microtubérculos únicamente cuando fueron cultivados en medios líquidos.

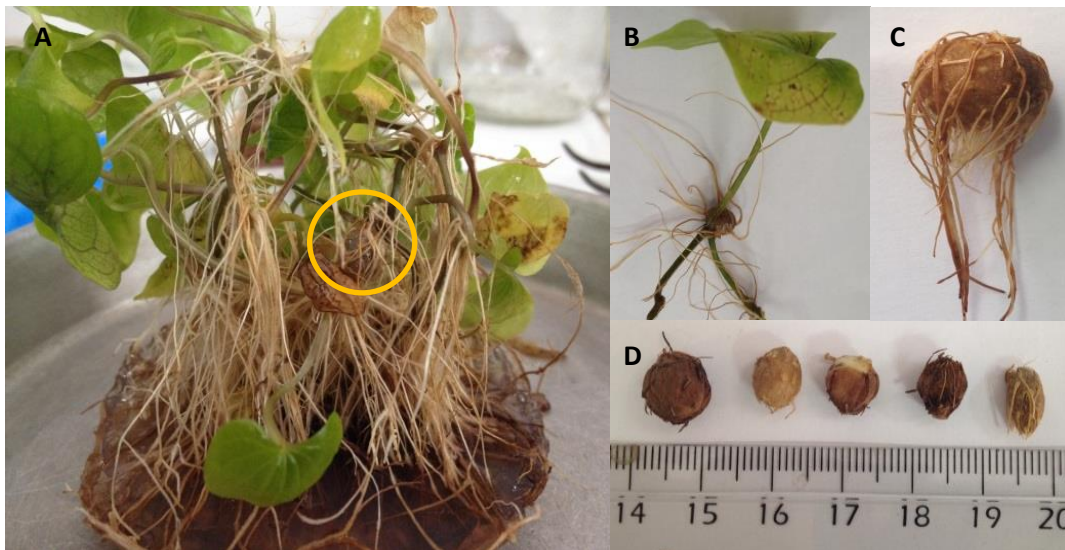


Figura 33. (A) Vitroplantas de clon colombiano mostrando un microtubérculo entre las raíces. Microtubérculos de dos meses de edad (D), formados en las axilas de las hojas (B) con numerosas raíces (C). Obtenidos en vitroplantas cultivadas en medio sólido, con las sales completas de MS e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz.

Las vitroplantas de clon D7 produjeron la mayor cantidad de microtubérculos (2,56 microtubérculos/explante) cuando fueron cultivadas en medio líquido con un 1/5 de las sales de MS y fotoperiodo de 12 horas de luz, con diferencias estadísticamente significativas entre los demás clones y tratamientos. Estas condiciones de cultivo también favorecieron la producción de microtubérculos para el clon D2, reportando 0,44 microtubérculos/explante, con diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. El clon D8 obtuvo 1,22 microtubérculos/explante en medios líquidos con las sales completas de MS y fotoperiodo de 12 horas de luz (**Figura 34**).



Figura 34. Microtubérculos de (A) clon colombiano, (B) clon D8, (C) clon D7, (D) clon D2 y (E) clon venezolano, obtenidos a los 6 meses de cultivo en vitroplantas cultivadas en medio líquido e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz.

Tabla 30. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el número de microtubérculos (NM) de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.

		Tratamientos							
		S 1/5MS 24h	S 1/5MS 12h	S MSC 24h	S MSC 12h	L 1/5MS 24h	L 1/5MS 12h	L MSC 24h	L MSC 12h
		$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$	$\bar{X} \pm ES$
Clones	CC	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	1,33 $\pm$ 0,29 ^b	0,44 $\pm$ 0,18 ^{bc}	0,67 $\pm$ 0,17 ^{bc}	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,22 $\pm$ 0,15 ^c
	CV	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,11 $\pm$ 0,11 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,11 $\pm$ 0,11 ^c
	D2	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,44 $\pm$ 0,18 ^{bc}	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,11 $\pm$ 0,11 ^c
	D7	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,33 $\pm$ 0,17 ^c	2,56 $\pm$ 0,29 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	1,22 $\pm$ 0,28 ^b
	D8	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	0,00 $\pm$ 0,00 ^c	1,11 $\pm$ 0,20 ^b	1,00 $\pm$ 0,24 ^{bc}	0,11 $\pm$ 0,11 ^c	1,22 $\pm$ 0,28 ^b

Consistencia del medio de cultivo: semisólido (SS) o líquido (L). Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC) o 1/5 de las sales de MS (1/5 MS). Fotoperiodo: 24 horas de luz o 12 horas de luz. La tabla indica el promedio ($\bar{X}$) y el error estándar (ES) del número de microtubérculos de cada clon en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos factores ($\alpha=0,5$), el cual indicó la existencia de diferencias significativas entre los clones ($p<0,05$. Factor 1) y entre tratamientos ($p<0,05$. Factor 2). Las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba a *posteriori* de Tukey ($\alpha=0,05$)

Antes de continuar con el análisis de los resultados obtenidos para los siguientes parámetros, es importante señalar que para los tratamientos en donde no se obtuvo formación de microtubérculos, tampoco se midió el diámetro, peso fresco ni peso seco. Por esta razón, se tomó la decisión de reducir las siguientes tablas y mostrar únicamente los resultados obtenidos para medio líquido, tomando en cuenta que los valores para el diámetro, peso fresco y peso seco de los microtubérculos de clon colombiano (el único clon que obtuvo microtubérculos en medio semisólido) fueron mayores en medios de cultivo líquido, con diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

En los protocolos para optimizar la microtuberización de las plantas de ñame, hacen mucho énfasis en el diámetro de los microtubérculos obtenidos, debido a que aquellos con mayor diámetro poseen una mayor superficie con yemas, lo cual favorece el desarrollo de numerosos brotes al momento de sembrarlos. La **Tabla 31** muestra el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo sobre el diámetro de los microtubérculos (DM), registrado para cada clon en los distintos tratamientos, luego de ocho meses de cultivo.

Tabla 31. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el diámetro de microtubérculos (en centímetros) de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.

		Tratamientos															
		L 1/5MS 24h				L 1/5MS 12h				L MSC 24h				L MSC 12h			
		$\bar{X}$	$\pm$	ES		$\bar{X}$	$\pm$	ES		$\bar{X}$	$\pm$	ES		$\bar{X}$	$\pm$	ES	
Clones	CC	0,37	$\pm$	0,15	bc	0,63	$\pm$	0,17	ab	—	—	—	—	0,16	$\pm$	0,11	bc
	CV	0,06	$\pm$	0,06	c	—	—	—	—	—	—	—	—	0,12	$\pm$	0,12	c
	D2	—	—	—	—	0,31	$\pm$	0,12	bc	—	—	—	—	0,07	$\pm$	0,07	c
	D7	0,31	$\pm$	0,17	bc	0,53	$\pm$	0,03	ab	—	—	—	—	0,49	$\pm$	0,07	ab
	D8	0,73	$\pm$	0,10	a	0,62	$\pm$	0,10	ab	0,08	$\pm$	0,08	c	0,51	$\pm$	0,08	ab

Consistencia del medio de cultivo: semisólido (SS) o líquido (L). Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC) o 1/5 de las sales de MS (1/5 MS). Fotoperiodo: 24 horas de luz o 12 horas de luz. La tabla indica el promedio ($\bar{X}$) y el error estándar (ES) del diámetro de los microtubérculos para cada clon en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA ($\alpha=0,5$). Las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba a *posteriori* de Tukey ($\alpha=0,05$).

El mayor diámetro de los microtubérculos (0,73 cm) se obtuvo en vitroplantas de clon D8, cultivadas en medios líquidos, con 1/5 de las sales de MS y luz blanca continua (Figura 35).



Figura 35. Microtubérculos de clon D8 obtenidos después de ocho meses de cultivo, en vitroplantas cultivadas en medio líquido, con 1/5 de las sales de MS e incubadas bajo luz blanca continua.

Unas condiciones de cultivo similares a las anteriores, pero bajo 12 horas de luz, favorecieron un incremento en el diámetro de los microtubérculos del clon colombiano (0,63 cm), clon D2 (0,31 cm) y clon D7 (0,53 cm), con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (Figuras 36, 37 y 38).



Figura 36. Microtubérculos de clon colombiano obtenidos después de ocho meses de cultivo, en vitroplantas cultivadas en medio líquido, con 1/5 de las sales de MS e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz.



Figura 37. Microtubérculos de clon D2 obtenidos después de ocho meses de cultivo, en vitroplantas cultivadas en medio líquido, con 1/5 de las sales de MS e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz.



Figura 38. Microtubérculos de clon D7 obtenidos después de ocho meses de cultivo, en vitroplantas cultivadas en medio líquido, con 1/5 de las sales de MS e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz.

El clon venezolano obtuvo el mayor diámetro de sus microtubérculos (0,12 cm) en medios con las sales completas de MS y bajo fotoperiodo de 12 horas de luz (**Figura 39**).



Figura 39. Microtubérculos de clon venezolano obtenidos después de ocho meses de cultivo en vitroplantas cultivadas en medio líquido, con las sales completas de MS e incubadas bajo fotoperiodo de 12 horas de luz.

Generalmente, el tamaño de los microtubérculos es equivalente a la cantidad de almidón almacenado en sus células parenquimatosas; sin embargo, no siempre los microtubérculos grandes tienen una gran cantidad de sustancias de reserva almacenadas, algunas veces es únicamente agua que hincha sus células y que se pierde a los pocos días de haber sembrado los microtubérculos en condiciones de invernadero.

Los primeros brotes que emergen de las yemas de los microtubérculos toman sus nutrientes de las sustancias de reserva almacenadas durante la formación de dicho órgano, hasta que puedan desarrollar su maquinaria fotosintética y separarse de la condición heterótrofa. En los tubérculos con pocas sustancias de reservas acumuladas, la escasez de nutrientes provoca el retraso del brote de las yemas y casi siempre mueren. Por esta razón, no sólo es importante medir el diámetro y el peso fresco de los microtubérculos, sino también su peso seco.

En la **Tabla 32** se muestra el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo, sobre el peso fresco de los microtubérculos (PFM).

Tabla 32. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el peso fresco de microtubérculos (en gramos) de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.

		Tratamientos															
		L 1/5MS 24h				L 1/5MS 12h				L MSC 24h				L MSC 12h			
		$\bar{X}$	$\pm$	ES		$\bar{X}$	$\pm$	ES		$\bar{X}$	$\pm$	ES		$\bar{X}$	$\pm$	ES	
Clones	CC	0,29	$\pm$	0,14	^{bc}	0,91	$\pm$	0,30	^a	—	—	—	—	0,09	$\pm$	0,07	^{bc}
	CV	0,02	$\pm$	0,02	^c	—	—	—	—	—	—	—	—	0,09	$\pm$	0,09	^{bc}
	D2	—	—	—	—	0,21	$\pm$	0,13	^{bc}	—	—	—	—	0,03	$\pm$	0,03	^c
	D7	0,09	$\pm$	0,06	^{bc}	0,24	$\pm$	0,04	^{bc}	—	—	—	—	0,30	$\pm$	0,07	^{bc}
	D8	0,41	$\pm$	0,10	^b	0,42	$\pm$	0,11	^b	0,03	$\pm$	0,03	^c	0,28	$\pm$	0,06	^{bc}

Consistencia del medio de cultivo: semisólido (SS) o líquido (L). Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC) o 1/5 de las sales de MS (1/5 MS). Fotoperiodo: 24 horas de luz o 12 horas de luz. La tabla indica el promedio ($\bar{X}$) y el error estándar (ES) del peso fresco de los microtubérculos para cada clon en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA ($\alpha=0,5$). Las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba a *posteriori* de Tukey ($\alpha=0,05$).

El medio de cultivo líquido y el fotoperiodo de 12 horas de luz favorecieron el incremento en el peso fresco de los microtubérculos de los cinco clones de ñame. Sin embargo, la concentración de las sales de MS arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos para los cinco clones de ñame: el clon colombiano, el clon D2 y el clon D8 obtuvieron los mejores resultados en medios con 1/5 de las sales de MS (0,91; 0,21 y 0,42 g, respectivamente), mientras que el clon venezolano (0,09 g) y el clon D7 (0,30 g) mostraron el mayor peso fresco de los microtubérculos en medios con las sales completas de MS.

En la **Tabla 33** se muestra el efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo sobre el peso seco de los microtubérculos (PSM).

Tabla 33. Efecto de la consistencia física del medio de cultivo, la concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS) y el fotoperiodo, sobre el peso seco de microtubérculos (en gramos) de cinco clones de ñame (clon colombiano (CC), clon venezolano (CV), clon D2, clon D7, clon D8), luego de ocho meses de cultivo.

		Tratamientos															
		L 1/5MS 24h				L 1/5MS 12h				L MSC 24h				L MSC 12h			
		$\bar{X}$	$\pm$	ES		$\bar{X}$	$\pm$	ES		$\bar{X}$	$\pm$	ES		$\bar{X}$	$\pm$	ES	
Clones	CC	0,01	$\pm$	0,00	abc	0,02	$\pm$	0,01	a	—	—	—	—	0,01	$\pm$	0,00	bc
	CV	0,003	$\pm$	0,00	bc	—	—	—	—	—	—	—	—	0,002	$\pm$	0,00	bc
	D2	—	—	—	—	0,01	$\pm$	0,00	bc	—	—	—	—	0,001	$\pm$	0,00	c
	D7	0,004	$\pm$	0,00	bc	0,02	$\pm$	0,00	ab	—	—	—	—	0,01	$\pm$	0,00	ab
	D8	0,02	$\pm$	0,00	ab	0,01	$\pm$	0,00	abc	0,001	$\pm$	0,00	c	0,01	$\pm$	0,00	ab

Consistencia del medio de cultivo: semisólido (SS) o líquido (L). Concentración de las sales de Murashige y Skoog (MS): formulación completa (MSC) o 1/5 de las sales de MS (1/5 MS). Fotoperiodo: 24 horas de luz o 12 horas de luz. La tabla indica el promedio ($\bar{X}$) y el error estándar (ES) del peso seco de los microtubérculos para cada clon en cada tratamiento. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA ($\alpha=0,5$). Las letras señalan las diferencias entre los grupos determinadas mediante una prueba a *posteriori* de Tukey ($\alpha=0,05$).

El medio de cultivo líquido y la reducción de las sales de MS favorecieron el incremento en el peso seco de los microtubérculos de los cinco clones de ñame, siendo la condición fotoperiódica la que determinó cuales fueron los mejores resultados obtenidos para cada clon, con diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos: el clon venezolano y el clon D8 obtuvieron el mayor peso seco de sus microtubérculos bajo luz blanca

continúa (0,003 y 0,02 g, respectivamente), mientras que el clon colombiano, el clon D2 y el clon D7 obtuvieron el mayor peso seco de sus microtubérculos bajo 12 horas de luz (0,02; 0,01 y 0,02 g, respectivamente).

Según los resultados obtenidos, el principal factor que determinó la producción de los microtubérculos fue la consistencia física del medio de cultivo. En la mayoría de los clones, el mayor número de microtubérculos, el mayor diámetro y el mayor peso fresco se obtuvo en vitroplantas cultivadas en medios líquidos. Este resultado ha sido reportado por otros investigadores (Kadota y Niimi, 2004; Yan y col., 2011); quienes lo atribuyen a la relativa facilidad con que se absorben los nutrientes disueltos en el medio de cultivo líquido en comparación al medio de cultivo semisólido.

Estos resultados también coinciden con los publicados por Yan y col. (2011), quienes estudiaron la microtuberización de *Dioscorea fordii*, reportando que la mayor frecuencia de tuberización (77,3 %), el mayor número de microtubérculos por planta (0,9) y el mayor diámetro promedio de los microtubérculos (8 mm) se obtuvo en medios líquidos suplementados con 1 mg/l de BA, 0,1 mg/l de ANA, 30 g/l de sacarosa, 1,5 g/l de carbón activado y fotoperiodo de 12 horas de luz.

El segundo factor evaluado fue la concentración de las sales de MS, registrándose buenos resultados para el número de microtubérculos, diámetro y peso fresco tanto en medios con las sales completas de MS como en medios con 1/5 de las sales de MS, dependiendo del clon. Para el parámetro peso seco de los microtubérculos, los mayores valores registrados para cada clon siempre se obtuvieron en medios de cultivo con las sales reducidas a 1/5 de la concentración original. Algunos investigadores señalan que someter a las vitroplantas a condiciones de estrés, puede generar el incremento en el número de microtubérculos (Chen y col., 2007; Yan y col., 2011). Como se ha comentado en este capítulo, reducir las sales a 1/5 de la concentración implica un estrés para las vitroplantas por la reducción de los nutrientes minerales a menos del 50% de su concentración original. Esta condición aumenta la producción de microtubérculos quizás como una alternativa para almacenar los pocos nutrientes presentes en el medio de cultivo y perpetuar la especie. Si

observamos las distintas tablas en donde se registraron los resultados obtenidos para cada parámetro medido, nos damos cuenta que siempre el valor que obtuvo la mayor diferencia significativa en comparación con el resto de los tratamientos, independientemente del clon en donde se obtuvo, fue en medios con las sales de MS reducidas a 1/5 de su concentración original.

En el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, Marilyn Royero y Rudy Cabrita estudiaron el efecto de la concentración de las sales de MS, la adición de reguladores de crecimiento (ANA y BA), la concentración de sacarosa y el fotoperiodo, con el propósito de optimizar la micropropagación y la microtuberización de ñame. Royero y col. (2007) reportaron que el 82,1% de las vitroplantas regeneradas de *D. alata* produjeron microtubérculos en medios semisólidos con 1/5 de las sales de MS, a los seis meses de cultivo. Por otra parte, Cabrita (2014) reporta que el mayor número de microtubérculos por planta de *D. alata* clon colombiano (1,3), de mayor diámetro (0,7 cm), peso fresco (0,4 g) y peso seco (0,1 g), se obtuvo en medios semisólidos con 1/5 de las sales de MS, suplementado con 30 g/l de sacarosa, 2 mg/l de Paclobutrazol (PBZ) y bajo fotoperiodo de 12 horas de luz, a los seis meses de cultivo. Los resultados de la presente investigación son muy similares a los reportados por estas investigadoras.

Generalmente, el fotoperiodo es el principal factor que debe ser estudiado cuando se desea diseñar un protocolo para optimizar la microtuberización de cualquier especie tuberosa. Casi siempre se evalúan dos condiciones: una de días cortos (8 o 12 h de luz) y otra de días largos (16 o 24 h de luz). En casi la mayoría de las publicaciones en donde se ha estudiado el efecto del fotoperiodo sobre la microtuberización de las plantas de ñame, los investigadores concluyen que la condición fotoperiódica de días cortos fue indispensable para inducir la formación de microtubérculos, mientras que las condiciones de días largos inhibieron este proceso (Posthumus, 2000; Vaillant y col., 2005; Rodríguez-Falcón y col., 2006; Sarkar, 2010). En nuestra investigación, el mayor número de microtubérculos por explante y el mayor peso fresco se obtuvo siempre bajo condiciones fotoperiódicas de 12 horas de luz, en los cinco clones de ñame estudiados. Los microtubérculos de clon D8 fueron los únicos que mostraron un mayor diámetro y peso

seco cuando las vitroplantas fueron cultivadas bajo luz blanca continua, por lo que quizás esto sea una respuesta genotipo dependiente.

Las fluctuaciones en la longitud del día determinan el tiempo para que ocurra la floración en muchas especies vegetales, y en las especies tuberosas son críticas para promover la diferenciación de los tubérculos. La longitud del día es percibida en las hojas y bajo condiciones inductivas de días cortos, ésta sintetiza una señal sistémica que es transportada a los estolones subterráneos para inducir el inicio del desarrollo de los tubérculos (Rodríguez-Falcón y col., 2006). Por esta razón, el fotoperiodo siempre jugará un papel importante en los proceso de microtuberización.

Los resultados de este trabajo corroboran las ventajas que posee la micropropagación y la microtuberización de las plantas de ñame sobre el cultivo convencional. Se logró obtener un gran número de plantas, en corto tiempo y en espacio reducido, así como también microtubérculos sanos que pueden ser utilizados como semilla, disminuyendo los costos asociados al mantenimiento del cultivo y al transporte y conservación de los tubérculos para su venta.

Las vitroplantas fueron inducidas a formar microtubérculos subcultivándolas en medios líquidos e incubándolas durante seis meses bajo condiciones fotoperiódicas de 12 horas de luz, obteniendo una gran cantidad de microtubérculos con muchas yemas y reduciendo casi a la mitad el tiempo que se debe esperar para poder cosechar estos tubérculos cuando se cultiva de manera convencional. No queda duda que los clones de ñame estudiados representan un material genético muy valioso para nuestro país, razón por la cual se hizo imperiosa la necesidad de establecer y conservar un banco de germoplasma *in vitro* en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, en donde se mantienen 20 vitroplantas de cada clon, cultivadas en medios semisólidos, con las sales completas de MS y bajo condiciones de luz blanca continua.

4. CONCLUSIONES

4.1 Establecimiento *in vitro* de las plantas que se utilizaron como fuente de explante para la micropropagación de seis clones de ñame

4.1.1 El protocolo de desinfección establecido por Royero y col. (2007) resultó ser adecuado para el establecimiento *in vitro* de cinco clones de ñame (D2, D7, D8, colombiano y venezolano), logrando obtener para cada uno de ellos más del 75% de segmentos nodales libres de contaminación. El clon D13 presentó problemas durante el establecimiento *in vitro*, debido a la oxidación de sus tejidos y a la presencia de patógenos, principalmente hongos, que provocaron la muerte de la mayoría de los segmentos nodales a los 5 días de haber iniciado el cultivo.

4.1.2 Las yemas de los segmentos nodales desinfectados se desarrollaron en vitroplantas vigorosas con un sistema radical profuso, luego de dos meses de cultivo en medios semisólidos y bajo luz blanca continua.

4.2 Micropropagación de los clones de ñame

4.2.1 La combinación hormonal de Ácido Naftalenacético (ANA) con Benciladenina (BA), indujo la formación de un callo de coloración blancuzca y apariencia compacta, lo cual favoreció la multiplicación de los brotes tanto en medio semisólido como en medio líquido. Sin embargo, se cree que la presencia de estos reguladores de crecimiento aceleró la oxidación de los compuestos fenólicos liberados en las vitroplantas de clon venezolano, clon D2, clon D7 y clon D8, evidenciándose el oscurecimiento de los vástagos, las raíces y el medio de cultivo. La oxidación fue mucho más pronunciada en las vitroplantas cultivadas en medio líquido, debido probablemente a la mayor difusión de oxígeno por la agitación continua del medio, requiriendo del subcultivo frecuente a medios frescos. Las vitroplantas de clon colombiano no mostraron problemas de oxidación.

4.2.2 A pesar de la oxidación de los tejidos, se logró la micropropagación de los cinco clones de ñame, con numerosos brotes de distintos tamaños y un sistema radical profuso,

luego de dos meses de cultivo en medio MS semisólido y líquido, bajo luz blanca continua.

4.2.3 El medio semisólido favoreció el incremento en el número de brotes para el clon venezolano, clon colombiano, clon D2 y clon D7. Por otra parte, la reducción de la concentración de las sales de MS y la incubación de las vitroplantas bajo luz blanca continua también tuvieron un efecto positivo sobre este parámetro de crecimiento, excepto para el clon venezolano.

4.2.4 El medio líquido y la formulación completa de las sales de MS favorecieron la elongación de los brotes en la mayoría de los clones, excepto para el clon D2. Por otra parte, la incubación bajo luz blanca continua incrementó la longitud de los brotes en los clones D2, D7 y D8.

4.2.5 Con relación al número de raíces, la heterogeneidad de los resultados obtenidos no permitió reportar cuáles fueron las mejores condiciones de cultivo para los cinco clones, debido a que no hay una consistencia física del medio de cultivo, una concentración de las sales o una condición fotoperiódica que haya sido favorecedora para la mayoría de los clones de ñame.

4.2.6 El análisis estadístico de los datos obtenidos para la longitud de las raíces mostró que no existen diferencias significativas entre los clones ni tratamientos, lo que quiere decir que ninguna de las combinaciones de los factores evaluados tuvo efecto sobre este parámetro. Sin embargo, se puede inferir que el medio semisólido favoreció la elongación de las raíces, excepto para el clon colombiano, mientras que la formulación completa de las sales de MS y las condiciones fotoperiódicas de 12 horas de luz tuvieron un efecto positivo, excepto para el clon venezolano y el clon D2.

4.2.7 El medio líquido favoreció el incremento del peso fresco de las raíces, excepto en el clon D2. Por otra parte, la reducción de la concentración de las sales de MS arrojó mejores resultados, excepto para el clon venezolano, y la incubación bajo luz blanca

continúa incrementó el peso fresco de las raíces de los clones de ñame, excepto para el clon colombiano y el clon D7.

4.3 Microtuberización de los clones de ñame

4.3.1 El medio líquido favoreció la formación de microtubérculos en cuatro de los cinco clones estudiados, siendo el clon colombiano el único que produjo microtubérculos en medio semisólido y bajo unas condiciones de cultivo específicas: las sales completas MS y fotoperiodo de 12 horas de luz. Las vitroplantas de clon D7 produjeron la mayor cantidad de microtubérculos (2,56 microtubérculos/explante) cuando fueron cultivadas en medio líquido con un 1/5 de las sales de MS y fotoperiodo de 12 horas de luz.

4.3.2 El mayor diámetro de los microtubérculos (0,73 cm) se obtuvo en vitroplantas de clon D8, cultivadas en medios líquidos, con 1/5 de las sales de MS y luz blanca continua. Unas condiciones de cultivo similares a las anteriores, pero bajo 12 horas de luz, favorecieron un incremento en el diámetro de los microtubérculos del clon colombiano (0,63 cm), clon D2 (0,31 cm) y clon D7 (0,53 cm), con diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. El clon venezolano obtuvo el mayor diámetro de sus microtubérculos (0,12 cm) en medios con las sales completas de MS y bajo fotoperiodo de 12 horas de luz.

4.3.3 El medio de cultivo líquido y el fotoperiodo de 12 horas de luz favorecieron el incremento en el peso fresco de los microtubérculos de los cinco clones de ñame. Sin embargo, la concentración de las sales de MS arrojó diferencias estadísticamente significativas entre los cinco clones de ñame: el clon colombiano, el clon D2 y el clon D8 obtuvieron los mejores resultados en medios con 1/5 de las sales de MS (0,91; 0,21 y 0,42 g, respectivamente), mientras que el clon venezolano (0,09 g) y el clon D7 (0,30 g) mostraron el mayor peso fresco de los microtubérculos en medios con las sales completas de MS.

4.3.4 El medio de cultivo líquido y la reducción de las sales de MS favorecieron el incremento en el peso seco de los microtubérculos de los cinco clones de ñame, siendo la condición fotoperiódica la que determinó cuales fueron los mejores resultados

obtenidos para cada clon, con diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos: el clon venezolano y el clon D8 obtuvieron el mayor peso seco de sus microtubérculos bajo luz blanca continua (0,003 y 0,02 g, respectivamente), mientras que el clon colombiano, el clon D2 y el clon D7 obtuvieron el mayor peso seco de sus microtubérculos bajo 12 horas de luz (0,02; 0,01 y 0,02 g, respectivamente).

INTEGRACIÓN DE LOS RESULTADOS

El ñame es un cultivo muy común en cualquier mercado popular; sin embargo, los consumidores de los grandes centros urbanos desconocen muchos de sus valores nutricionales, los cuales, por otra parte, si son apreciados por los pobladores rurales y por las tribus indígenas de gran parte de nuestro territorio.

Este desconocimiento se extiende incluso a nivel científico y tecnológico, por cuanto a pesar de saber que entre las distintas especies de ñame se pueden encontrar genotipos con un alto valor agronómico, ideales para ser utilizados en programas de mejoramiento, la información que se tiene acerca del material genético disponible y sus características morfológicas, moleculares y nutricionales es relativamente escasa.

Ante estos hechos, se planteó como objetivo general de este trabajo, caracterizar a nivel morfológico, molecular y nutricional, seis clones de ñame y optimizar los procesos de micropropagación y microtuberización; todo ello con el propósito fundamental de establecer un banco de germoplasma *in vitro* de este cultivo, que permita resguardar la variabilidad genética del mismo. Con la caracterización de los clones que conforman este banco de germoplasma, se pretende establecer analogías y diferencias entre accesiones, identificar el material promisorio para definir estrategias de manejo del cultivo y generar información científica que permita el óptimo aprovechamiento de estos recursos.

Los tubérculos de los clones de ñame a los que se hace referencia, fueron donados en su mayoría por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), se trata de los catalogados como D2, D7, D8, D13 y clon venezolano. Al último de los seis clones seleccionados para la investigación, se le dio el nombre de clon colombiano y fue donado por el Laboratorio de Procesos Vegetales de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Pontificia Bolivariana (UPB), con sede en Montería, Colombia. Estos tubérculos fueron separados en dos grupos, el primero de ellos con el fin de caracterizar sus almidones desde el punto de vista nutricional y el segundo para establecer un banco de germoplasma *ex situ* en las instalaciones del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal del Instituto de Biología Experimental (IBE) de la Universidad Central de Venezuela (UCV).

Para la caracterización morfológica de los seis clones de ñame, se evaluaron 86 descriptores relacionados con las características del tallo, hojas y tubérculos, de los cuales 43 resultaron ser verdaderamente discriminatorios. Entre los descriptores morfológicos referidos al tallo de las plantas de ñame, resaltan dos de ellos que permitieron diferenciar los clones a simple vista: la ausencia/presencia de alas en el tallo y el color que exhiben estas prolongaciones. Con relación a las características de las hojas se observaron variaciones en cuanto a la forma, el color del peciolo y de sus alas. Para los tubérculos, se registró variación en la forma, la ramificación, así como en el color y textura de la pulpa.

Los datos obtenidos de la caracterización morfológica de los clones de ñame, fueron sometidos a un Análisis de Componentes Principales (ACP) y a un Análisis de Conglomerados que permitió la construcción de Dendrogramas a partir de matrices de similitud basadas en el coeficiente de Jaccard.

El ACP reveló que los tres primeros componentes (forma del tubérculo, forma de la hoja y longitud del ápice foliar) representan el 77,88 % de la variabilidad que existe entre los seis clones de ñame. De hecho, se pudo determinar mediante este análisis, que un 69,7 % de los descriptores evaluados tiene un alto poder discriminatorio. El análisis de conglomerados arrojó una matriz de similitud con valores que oscilan entre 0,68 y 0,91. Con los datos de esta matriz se elaboró un dendrograma donde se observa que los pares de clones que comparten el mayor número de características son el clon venezolano y el clon D7, seguidos del clon D8 y el clon D2 y por último el clon colombiano y el clon D13.

Para la caracterización molecular, se realizó un análisis utilizando 15 combinaciones de iniciadores de tipo AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Como resultado de esta fase de la investigación se registraron 219 fragmentos amplificados con un tamaño comprendido entre 250 a 8000 pb. Las 15 combinaciones de iniciadores AFLP arrojaron un 71,23 % de polimorfismo entre los clones. La combinación que posee el mayor poder discriminatorio resultó ser Ase08-Taq07, generando 15 bandas amplificadas con un 93,33 % de polimorfismo. Es importante resaltar que a pesar de que el clon colombiano pertenece a la especie *D. alata*, al igual que los otros cinco clones, el patrón de bandas registrado para este genotipo reflejó un 47,94 % de polimorfismo intraespecífico.

El dendrograma generado por el análisis de conglomerados mostró la formación de tres grupos. El grupo 1 está conformado por el clon venezolano, clon D13, clon D8, clon D7 y clon D2, siendo los clones D8 y D7 los que poseen el mayor índice de similitud entre ellos (0,923). El grupo 2 conformado por el clon colombiano con un índice de similitud de 0,310. Por último, el genotipo de una variedad nativa de papa (utilizada como control) conforma el grupo más lejano (grupo 3) y por lo tanto el menos relacionado con los genotipos de ñame. La caracterización molecular permitió asegurar que no existen duplicados en la colección y que cada clon corresponde a una variedad distinta dentro de la especie *D. alata*.

Adicionalmente, se realizó un análisis de conglomerados con el propósito de agrupar los resultados obtenidos de la caracterización morfológica y la molecular, generando un “dendrograma consenso” en el cual la distribución de los clones se asemeja a la obtenida para la caracterización molecular, pero se diferencia de la caracterización morfológica, debido muy probablemente a que los caracteres morfológicos están influenciados por el ambiente lo cual provoca cambios a nivel fenotípico, dando la apariencia de que hay más accesiones de las que en realidad existen en una colección de germoplasma.

Luego de realizar la caracterización morfológica y molecular de los seis clones de ñame, se procedió a la caracterización nutricional de los almidones de sus tubérculos. La estimación de los contenidos de almidón disponible y de almidón resistente total, así como la cinética de α -amilólisis, son los principales parámetros que explican la digestibilidad de los alimentos amiláceos. La determinación del almidón resistente ha cobrado gran interés en los últimos años, por cuanto se le considera un elemento importante en la nutrición humana, dado que sus funciones son similares a las de la fibra alimentaria con múltiples beneficios para la salud.

La extracción del almidón de los tubérculos de los clones de ñame, excepto los del clon colombiano, se llevó a cabo en el Laboratorio de Polisacáridos Vegetales del IBE. Es oportuno acotar que el almidón extraído de los tubérculos de clon colombiano, fue enviado desde la UPB. Para evaluar la digestibilidad *in vitro* de los almidones, se estimó el contenido de almidón disponible, almidón resistente total y la cinética de hidrólisis tanto de muestras crudas como de muestras gelatinizadas.

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y una prueba *a posteriori* de diferencias mínimas significativas de Fisher (LSD), utilizando el programa estadístico Minitab® 16. Los gráficos que muestran la cinética de hidrólisis de los almidones de ñame se realizaron con el programa Origin® versión 8.5.

El rendimiento de extracción de los almidones de los cinco clones venezolanos de ñame osciló entre 2,95 y 5,13 % ; estos valores fueron significativamente menores al reportado para el almidón del clon colombiano (25,87 %). Esto se debió probablemente al uso de compuestos químicos durante el proceso de extracción del almidón, tales como el bisulfito de sodio y una solución de amoníaco. Dichos compuestos optimizan el proceso de extracción al disminuir las impurezas y pigmentos que pueda tener la pulpa del tubérculo, dejando al almidón más accesible para su aislamiento.

A todos los almidones se les determinó la humedad según el protocolo descrito por la AOAC International (1984). Se registraron porcentajes de humedad entre 5,82 % (clon venezolano) y 11,86 % (clon colombiano).

Se estimaron altos porcentajes de almidón disponible, entre 80 a 89%, con diferencias estadísticamente significativas entre ellos. El clon venezolano y el clon colombiano mostraron los mayores porcentajes de almidón disponible, mientras que el clon D2 obtuvo el menor porcentaje debido probablemente a la presencia de materiales no amiláceos como el mucílago y las antocianinas, las cuales son consideradas como contaminantes durante la extracción del almidón e inhiben la acción de las enzimas amilolíticas.

El clon venezolano presentó el mayor porcentaje de almidón resistente (71%), mientras que la fracción más pequeña se obtuvo en los almidones de clon colombiano (53%). Estos valores son mayores que los reportados para el almidón de plátano hartón (45 %) utilizado como referencia por su alto contenido de almidón resistente. Los porcentajes de almidón resistente reportados para los clones D2, D7, D8 y D13 no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Con relación a la cinética de hidrólisis *in vitro* de los almidones de los clones de ñame, todos los almidones evaluados en su estado crudo presentaron valores muy bajos: una velocidad inicial entre 0,2 y 1,1 %, y una magnitud final de hidrólisis entre 0,5 y 2,1 %. La cinética de hidrólisis *in vitro* de los almidones gelatinizados, es decir aquellos que fueron sometidos a cocción previo al análisis enzimático, fue mucho mayor que la obtenida para los almidones crudos, con velocidades iniciales comprendidas entre 66 y 70 % y magnitudes finales de hidrólisis entre 88 y 96 %. Estos valores superan a los reportados para el almidón de maíz gelatinizado utilizado como referencia, el cual registró una velocidad inicial de 60,3 % y magnitud final de 82,9 %. El almidón del clon D8 presentó la mayor magnitud final de hidrólisis (96,29 %) y el clon venezolano presentó la menor magnitud final de hidrólisis (88,10 %).

Estos resultados relacionados con la caracterización nutricional, permitieron proponer al almidón del clon venezolano como ingrediente para la elaboración de alimentos dirigidos a promover una óptima funcionalidad gastrointestinal, con paso moderado de glucosa a la sangre, por ser el que obtuvo el mayor contenido de almidón disponible y de almidón resistente total, pero a su vez la menor tasa de hidrólisis. Asimismo, se propone a los almidones aislados de los clones D7, D8 y D13 como ingredientes para la elaboración de alimentos dirigidos a deportistas que requieran un rápido aporte energético, debido a que estos clones también poseen un alto contenido de almidón disponible y de almidón resistente total, con las mayores tasas de hidrólisis.

Posterior a la caracterización morfológica, molecular y nutricional de los clones de ñame seleccionados para este trabajo, se procedió a establecer su cultivo *in vitro* y a optimizar los procesos de micropropagación y microtuberización, variando la consistencia física del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS, 1962), la concentración de las sales que lo componen y el fotoperiodo. Todas estas actividades tuvieron como propósito establecer el banco de germoplasma *in vitro* de ñame en el Laboratorio de Mejoramiento Vegetal, con la inclusión de estos seis clones ya caracterizados.

Para evaluar el efecto de la consistencia física del medio de cultivo sobre la micropropagación y microtuberización, se tomaron 36 microesquejes de las vitroplantas de

los seis clones de ñame y se cultivaron en medios MS semisólidos y líquidos suplementados con 0,5 mg/l de Ácido Naftalenacético (ANA) y 1 mg/l de Benciladenina (BA). Todo el material se incubó bajo luz blanca continua, a 25 ± 1 °C, durante dos meses.

Para evaluar el efecto de la concentración de las sales de MS y el fotoperiodo sobre la micropropagación y microtuberización de ñame, las vitroplantas se subcultivaron en dos tipos de medios: uno con las sales completas de MS y otro con las sales reducidas a 1/5 de su concentración original. Todo el material se incubó a 25 ± 1 °C durante seis meses, variando las condiciones lumínicas: fotoperiodo de 12 horas de luz y luz blanca continua. Al finalizar esta experiencia se midieron los siguientes parámetros: número de brotes (NB), longitud de los brotes (LB), número de raíces (NR), longitud de las raíces (LR), peso fresco de las raíces (PFR), número de microtubérculos por planta (NM), diámetro (DM), peso fresco (PFM) y peso seco de los microtubérculos (PSM). Para el análisis estadístico de los datos obtenidos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba *a posteriori* de rangos múltiples de Tukey.

Los resultados de este trabajo corroboran las ventajas que posee la micropropagación y la microtuberización de las plantas de ñame sobre el cultivo convencional. Se logró obtener un gran número de plantas, en corto tiempo y en espacio reducido; y microtubérculos sanos que pueden ser utilizados como semilla, disminuyendo los costos asociados al mantenimiento del cultivo y al transporte y conservación de los tubérculos para su venta. Las vitroplantas fueron inducidas a formar microtubérculos subcultivándolas en medios líquidos e incubándolas durante seis meses bajo condiciones fotoperiodicas de 12 horas de luz, obteniendo una gran cantidad de microtubérculos con muchas yemas, y se redujo casi a la mitad el tiempo esperado para poder cosechar estos tubérculos cuando se cultiva de manera convencional. Los clones de ñame, objeto de este estudio, representan un material genético muy valioso para nuestro país, razón por la cual se hizo imperiosa la necesidad de establecer y conservar un banco de germoplasma *in vitro* en donde se mantienen las vitroplantas en un ambiente estéril y controlado, cultivándolas en medios semisólidos y bajo luz blanca continua.

La posibilidad de fomentar el uso y consumo de las raíces y tubérculos va a depender en gran medida del conocimiento que se disponga sobre sus principales componentes químicos y de las características físicas, nutricionales y funcionales que se les atribuyen para orientar sus posibles usos y aplicaciones. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral permitieron el resguardo de seis variedades de ñame, caracterizadas a nivel morfológico, molecular y nutricional, lo cual nos permite fomentar su consumo entre la población venezolana y promover la inclusión de estos materiales en programas de mejoramiento, con el propósito de obtener el máximo beneficio de las potencialidades de este importante cultivo.

CONCLUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en esta investigación permiten recomendar ampliamente el cultivo del ñame así como su consumo. Se logró la caracterización morfológica y molecular de los clones de ñame utilizando la lista de descriptores para el género *Dioscorea* y los marcadores moleculares AFLP. Los resultados muestran marcadas diferencias a nivel morfológico y un alto porcentaje de variabilidad genética (71,23%), lo cual asegura que no existen duplicados en la colección y los materiales estudiados corresponden a seis variedades distintas de la especie *D. alata*. El agrupamiento de los clones en el dendrograma obtenido de la caracterización morfológica no coincide con el registrado para la caracterización molecular, lo cual pueda deberse a que los caracteres morfológicos están influenciados por el ambiente lo cual provoca cambios a nivel fenotípico y puede llegar a alterar la caracterización.

También se evaluó la digestibilidad de los almidones extraídos de los tubérculos de los seis clones de ñame, estimando altos contenidos de almidón disponible y de almidón resistente total con altas tasas de hidrólisis, por lo que se proponen para la elaboración de alimentos que promuevan una óptima funcionalidad gastrointestinal con un rápido aporte energético.

Con la finalidad de resguardar la variabilidad genética de tan promisorio rubro, se estableció un banco de germoplasma *in vitro* optimizando las condiciones de cultivo que permitieron obtener un mayor número de vitroplantas sanas mediante micropropagación. Para ello se seleccionó el medio propuesto por Murashige y Skoog (1962), de consistencia sólida, con la formulación completa de las sales y la incubación bajo luz blanca continua. Luego de tres meses bajo estas condiciones, las vitroplantas muestran un crecimiento vigoroso y un sistema radical profuso.

Por último, el cultivo *in vitro* también permitió inducir la formación de microtubérculos, los cuales pueden ser utilizados como material vegetal de plantación (semilla), con una alta calidad fitosanitaria, producidos masivamente y en menor tiempo, en comparación a lo esperado cuando los tubérculos son cosechados de manera convencional. Próximamente, para dar cumplimiento a uno de los objetivos del proyecto CODECYT “Recuperación, mantenimiento y resguardo del banco de germoplasma de clones de ñame (*Dioscorea* sp)

mediante técnicas de cultivo *in vitro*”, los microtubérculos de los seis clones de ñame serán donados a los productores del estado Miranda y se les impartirá talleres y entrenamiento para mantener estas variedades en su localidad de origen donde podrán ser propagadas y utilizadas en beneficio de la población venezolana.

PERSPECTIVAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

1. El banco de germoplasma del Laboratorio de Mejoramiento Vegetal cuenta con una colección de 11 clones de ñame de los cuales se han caracterizado a nivel morfológico, molecular y nutricional seis de ellos. Por los resultados obtenidos de esta investigación, se hace imperativa la necesidad de caracterizar el resto de los clones para obtener una información mucho más completa de la variabilidad existente y de las propiedades que puedan resultar atractivas para los fitomejoradores y productores. En este sentido, este año con el financiamiento del Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) se llevara a cabo un proyecto titulado “Caracterización molecular de diez clones de ñame (*Dioscorea alata* L.) para el uso en programas de mejoramiento” mediante AFLP”, con el que se pretende caracterizar a nivel molecular los clones de ñame restantes e integrar toda la información que se tiene al respecto.
2. Entre los clones de ñame que se encuentran en el vivero del laboratorio, hay uno de ellos que posee características muy particulares, sus hojas son el doble de grandes de las hojas de los otros clones, su tallo también posee un diámetro mayor, produce bulbillos aéreos y parece ser resistente a enfermedades. Este clon fue identificado como *Dioscorea zingiberensis* y según referencias bibliográficas es ampliamente cultivado en China para la extracción de Diosgenina y la elaboración de anticonceptivos orales. En este sentido, se propone la evaluación farmacéutica de las sapogeninas esteroidales presentes en el tubérculo de esta planta para promover su uso en la elaboración de hormonas sexuales y anticonceptivos orales de producción nacional.

BIBLIOGRAFIA

Acuña, H. 2012. Extracción, caracterización y aplicación de almidón de ñame variedad blanco (*Dioscorea trifida*) originario de la región amazónica colombiana para la elaboración de productos horneados. Tesis de Especialización en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad Nacional de Colombia.

Aguilar, Z. 2012. Caracterización morfológica y molecular de la colección de *Dioscorea* spp. del banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica. Tesis de *Magister Scientiae* en Agricultura Ecológica. 107 pp.

Aguirre, A. 2014. Colección y caracterización morfológica de la diversidad de plantas medicinales de las provincias de Loja y Cotopaxi. Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Central del Ecuador. Quito, Ecuador. 181 pp.

Akisoe, N., Hounhouigan, J., Mestres, C., Ynago, M. 2004. Effect of tuber storage and pre and post blanching treatments on the physicochemical and pasting properties of dry yam flour. *Food Chemistry*, 85: 141-149.

Alizadeh, S., Mantell, S., Viana, A. 1998. *In vitro* shoot culture and microtuber induction in the steroid yam *Dioscorea composita* Hemsl. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 53: 107-112.

Álvarez, A. 2000. Prácticas agronómicas para el cultivo de ñame. Producción de semillas por Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá. Colombia. 112 pp.

Ammirato, P.V. 1976. Hormonal control of tuber formation in cultured axillary buds of *D. bulbifera* and *D. alata*. *Plant Physiology*. 57: 66-69.

AOAC International. 1984. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 14th edition. Washington D.C., EE. UU.

Araujo, C., Rincón, A., Padilla, F. 2004. Caracterización del almidón nativo de *Dioscorea bulbifera* L. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54: 241-245.

Arellano, M., Villavicencio, E., García, S. 2010. Producción de plántulas y semilla prebásica de variedades comerciales de papa libres de enfermedades. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México. pp 46.

Asiedu, R., Ng, SYC., Bai, K., Ekanayake, I., Wanyera, N. 1998. Genetic Improvement. In Orkwor, G., Asiedu, R., Ekanayake, I. (eds) Food yams: Advances in research, Ibadan, Nigeria: IITA and NRCRI, pp 63-104.

Bachem, C., Oomen, R., Visser, R. 1998. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 157-173.

Baco, M., Biaou, S., Jean- Paul, L. 2007. Complementarity between geographical and social patterns in the preservation of yam (*Dioscorea* spp.). Diversity in Northern Benin. *Economic Botany*, 61: 385-393.

Balogun, M. 2009. Microtubers in yam germplasm conservation and propagation: The status, the prospects and the constraints. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. 4: 001-010.

Balogun, M., Maroya, N., Asiedu, R. 2014. Status and prospects for improving yam seed systems using temporary immersion bioreactors. *African Journal of Biotechnology*. 13: 1614-1622.

Barker, D., Keatings, J., Asiedu, R. 1999. Yam dormancy: potential mechanisms for its manipulation. *Tropical Science*, 39: 168–177.

Baudi, S. 2006. Química de los alimentos. (4^{ta} edición). Prentice Hall. Edición S.A.D.C. C.V. Naucapal de Juárez, Edo. de México. pp: 80-92.

Becker, A., Hill, S., Mitchell, J. 2001. Relevance of amylose-lipid complexes to the behaviour of thermally processed starches. *Starch*, 53: 121–130.

Behera, K., Bhunia, B., Teixeira, J., Sahoo, S. 2010a. Plantlet regeneration of Potato Yam (*Dioscorea bulbifera* L.) through *in vitro* culture from nodal segments. *International Journal of Plant Developmental Biology*. 4: 37-41.

Behera, K., Sahoo, S., Prusti, A. 2010b. Micropropagation of Greater Yam (*Dioscorea alata* L.cv Hatikhujia) through vine nodes. *Journal of Root Crops*. 36: 27-32.

Bhattacharjee, R., Gedil, M., Sartie, A., Otoo, E., Dumet, D., Kikuno, H., Lava, P., Asiedu, R. 2011. Chapter 4, *Dioscorea*. pp 71-96. En: Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Industrial Crops. Editorial Springer Verlag Berlin Heidelberg. 218 pp.

Bhojwani, S., Dantu, P. 2013. Micropropagation. pp 245-274. En: Bhojwani, S., Dantu, P.K. Tissue Culture: An Introductory Text (1st edition). Springer. India. 309 pp

Biliaderis, C., Galloway, G. 1989. Crystallization behavior of amylose-V complexes: Structure-property relationships. *Carbohydrate Research*, 189: 31–48.

Blanco, A., Tovar, J., Fernández-Piedra, M. 2004. Caracterización nutricional de los carbohidratos y composición centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos cultivados en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54: 87-102.

Bonilla M., Hernández, O. 2012. Propagación *in vitro* de ñame (*Dioscorea* sp.): una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma. *Agronomía*. 20: 65-76.

Borges, M., Alarcón, Y., Malaurie, B., Hernández, Y., Silva, J. 2009a. Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (Dioscoreaceae). *Revista Peruana de Biología*, 16: 203-208.

Borges, M., Estrada, E., Pérez, I., Meneses, S. 2009b. Usos de distintos tratamientos de desinfección en el cultivo *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11: 127-135.

Borges, M., Destrade, R., Meneses, S., Gómez, R., Malaurie, B., Hamon, P. 2011. Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 13: 221-228.

Bousalem, M., Arnau, G., Hochu, I., Arnolin, R., Viader, V., Santoni, S., David, J. 2006. Microsatellite segregation analysis and cytogenetic evidence for tetrasomic inheritance in the American yam *Dioscorea trifida* and a new basic chromosome number in the Dioscoreaceae. *Theoretical and Applied Genetics*, 113:439–451.

Brenes, M. 2010. Determinación de la causa de los síntomas en tejido foliar de ñame amarillo (*Dioscorea cayenensis* Lam.) y su erradicación, enriqueciendo el medio de cultivo y usando técnicas de cultivo de meristemos, termo y quimioterapia en condiciones *in vitro*. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Brouns, F., Kettlitz, B., Arrigoni, E. 2002. Resistant starch and "the butyrate revolution". *Trends in Food Science & Technology*, 13: 251-261.

Buleón, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23: 85-112.

Burkill, I. 1960. Organography and evolution of Dioscoreaceae, the family of yams. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 56: 319-412.

Bustamante, S., Guzmán, M., Buitrago, G. 2001. Caracterización molecular de algunas especies y variedades de ñame presentes en la costa atlántica colombiana. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2: 1-6.

Cabrera, M., Gómez, R., Basail, M., Santos, A., Medero, V., López, J., Rayas, A., García, M., de Ventura, J. 2005. Production of yam microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83:103-107.

Cabrera, M., Gómez, R., Espinosa, E. 2011. Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L.) 'Pacala Duclos'. *Biotechnology Agronomy Society and Environment*. 15: 515-521.

Cabrita, R. 2014. Optimización de un sistema de regeneración *in vitro* para el clon criollo colombiano de ñame (*Dioscorea* sp.). Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.

Campos, Q., Seguel, B. 2000. Biotecnología y recursos genéticos vegetales. *Agro Sur*, 28: 1-5.

Carlos-Amaya, F., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Yee-Madeira, H., Bello-Pérez, L. 2011. Physicochemical and digestibility properties of double-modified banana (*Musa paradisiaca* L.) starches. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 1376-1382.

Castillo, J., Sulbarán, A., Berrío, T., Moreno, N. 2010. Caracterización morfológica de ocho cultivares de ñame (*Dioscorea alata* L.). *Revista Unellez de Ciencia y Tecnología*, 8: 47-51.

Cheng, H., Lai, M. 2000. Fermentation of resistant rice starch produces propionate reducing serum and hepatic cholesterol in rats. *The Journal of Nutrition*, 130: 1991-1995.

Chen, Y., Fan, J., Yi, F., Lou, Z., Fu, Y. 2003. Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 73:75:80.

Chen, F., Fu, Y., Wang, D., Gao, X., Wang, L. 2007. The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation and microtuberization of *Dioscorea nipponica* Makino. *Journal of Plant Growth Regulation*. 26: 38-45.

Cherrington, C., Hinton, M., Pearson, G., Chopra, I. 1991. Short-chain organic acids at pH 5.0 kill *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. without causing membrane perturbation. *Journal of Applied Bacteriology*, 70: 161-165.

Colonna, P., Leloup, V., Buleon, A. 1992. Limiting factors of starch hydrolysis. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46: S17-S32.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, Nueva York. 1262 pp.

Cubero, B. 1984. Caracterización del cultivo de ñame en la región central de Venezuela, estudio del enraizamiento y brotación. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 3: 122-125.

Cummings, J., Englyst, H. 1995. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61: S938-S945.

Cummings, J., Beatty, E., Kingman, S., Bingham, S., Englyst, H. 1996. Digestion and physiological properties of resistant starch in the human large bowel. *British Journal of Nutrition*, 75: 733-747.

Dansi, A., Mignouna, H., Zoundjhekpou, J., Sangare, A., Asiedu, R., Ahoussou, N. 2000. Using isozyme polymorphism to assess genetic variation within cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex) of the Benin Republic. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47: 371–383.

Das, S., Dutta, M., Mazumder, P. 2013a. *In vitro* propagation of genus *Dioscorea*-A critical review. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 6: 26-30.

Das, S., Dutta, M., Mazumder, P. 2013b. Micropropagation of *Dioscorea alata* L. through nodal segments. *African Journal of Biotechnology*. 12: 6611-6617.

de Lima, N., 2009. Caracterización genética de diferentes accesiones de *Phaseolus vulgaris* L. estimada a través de marcadores morfológicos y moleculares RAPD y SSR. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19:11-15.

Dumet, D., Ogunsola, D. 2008. Guías para la regeneración de germoplasma: ñame. En: Dullo, M., Thormann, I., Jorge, M., Hanson, J., editors. Crop specific regeneration guidelines. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 8 pp.

Durango, E. 2015. Embriogénesis somática en dos cultivares de ñame (*Dioscorea alata* L.). Tesis Doctoral en Biotecnología Agrícola. Escuela Socialista de Agricultura Tropical, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.

Egesi, C., Pillay, M., Asiedu, R., Egunjobi, J. 2002. Ploidy analysis in water yam *Dioscorea alata* L. germplasm. *Euphytica*, 128: 225–230

Egesi, C., Asiedu, R., Ude, G., Ogunyemi, S., Egunjobi, J. 2006. AFLP marker diversity in water yam (*Dioscorea alata* L.). *Plant Genetic Resources*, 4: 181–187.

Englyst, H., Kingman, S., Cumming, J. 1992. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46: 33-50.

Englyst, K., Englyst, H. 2005. Carbohydrate bioavailability. *British Journal of Nutrition*, 94: 1-11.

Englyst, H., Hudson, G. 2000. Carbohydrates. pp 61-76 en: Garrow, J.S., James, W.P.T., Ralph, A. Human Nutrition and Dietetics (10th edition). Churchill Livingstone. Edimburgo (Escocia).

Enríquez, G. 1991. Descripción y evaluación de los recursos genéticos. Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. pp 16-160.

Ezeibekwe, I., Ezenwaka, C., Mbagwu, F., Unamba C. 2009. Effects of combination of different levels of Auxin (NAA) and Cytokinin (BAP) on *in vitro* propagation of *Dioscorea rotundata* L. (White Yam). *Journal of Molecular Genetics*. 1: 18-22.

Ezeocha, V.C., Ojmelukwe, P.C. 2012 The impact of cooking on the proximate composition and anti-nutritional factors of water yam (*Dioscorea alata*). *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 3: 172–176.

FAO (Food and Agriculture Organization). 1991. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Raíces, tubérculos, plátanos y bananas en la nutrición humana. Roma, Italia: Colección FAO: Alimentación y nutrición humana, N° 24, 196 pp.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1996. *Global Plan of Action for the Conservation and Sustainable Utilization of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture*. Rome, Italy. 63 pp.

FAO (Food and Agriculture Organization). 1998. Enfoques: propiedades funcionales de los almidones. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento de Agricultura y Protección del Consumidor.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2014. *Normas para bancos de germoplasma de recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*. Roma, Italia. 182 pp.

FAOstat. 2014. Principales productores de alimentos y productos agrícolas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Departamento Económico y Social.

Farhat, I., Oguntona, T., Neale, R. 1999. Characterization of starches from West African yams. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50: 2105-2112.

Ferguson, L., Tasman-Jones, C., Englyst, H., Harris, P. 2000. Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. *Nutrition and cancer*, 36: 230-237.

Fotso, N., Sandrine, M., Désire, M., Pierre, D., Ndoumou, O. 2013. Micropropagation of *Dioscorea alata* L. from microtubers induced *in vitro*. *African Journal of Biotechnology*. 12: 1057-1067.

Franco, T., Hidalgo, R. 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín técnico N° 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. 89 pp.

Freitas, R., Paula, R., Feitosa, J., Rocha, S., Sierakowski, M. 2004. Amylose contents, rheological properties and gelatinization kinetics of yam (*Dioscorea alata*) and cassava (*Manihot utilissima*) starches. *Carbohydrate Polymers*, 55: 3-8.

Galeno, F. 2006. Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones nativos y modificados de apio y plátano. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.

Gallant, D., Bouchet, A., Buleón, A., Pérez, S. 1992. Physical characteristics of starch granules and susceptibility to enzymatic degradation. *European Journal of Clinical Nutrition*, 46: 3-16.

Ganong, W. 2003. Review of Medical Physiology (21^a edition). Lange Medical Books. Editorial McGraw-Hill. Nueva York. pp 511-515.

García, O. 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad *in vitro* y la biodisponibilidad de almidones nativos y modificados, utilizando el bioensayo con el gorgojo del arroz *Sitophilus oryzae*. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.

García, M., Escalona, M., Meneses, S. 2004. Efecto de la concentración de sacarosa y de reguladores de crecimiento en la tuberización *in vitro* de *Dioscorea alata* L. variedad Cartagena. *Biotecnología vegetal*. 4: 243-246.

George, E., Hall, M., Jan de Klerk, G. 2008. Plant propagation by tissue culture. Third edition Edition. Springer. pp 494.

Gómez, R. 2000. Guía para las caracterizaciones morfológicas básicas en colecciones de papas nativas. Departamento de Mejoramiento y Recursos Genéticos. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú. 27 pp.

Goñi, I., García-Díaz, L., Mañas, E., Saura-Calixto, F. 1996. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. *Food Chemistry*, 56: 445-449.

González, M. 2012. El ñame (*Dioscorea* sp.): Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos tropicales*, 33: 5-15.

González, Y. 2003. Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE. Costa Rica. Tesis de *Magister Scientiae*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 93 pp.

González-Quilen, C. 2013. Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz (*Sitophilus oryzae* L.) de almidones de banano. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.

Granfeldt, Y., Drews, A., Björck, I. 1995. Arepas made from high amylose corn flour produce favorably low glucose and insulin responses in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, 125: 459-465.

Grewal, S., Kaul, S., Sachdeva, V., Atal, C. 1977. Regeneration of plants of *Dioscorea deltoidea* Wall. by apical meristem cultures. *Indian. Journal of Experimental Biology*. 15: 201-213.

Heping, H., Shanlin, G., Lanlan, C., Xiaoke, J. 2008. *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 44: 448-455.

Hernández, A. 2013. Caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. *Revista Bio-Ciencias*, 2: 113-118.

Herrera, E. 1997. Digestibilidad *in vitro* de los almidones de lenteja, apio, sorgo y maíz nativos y modificados. Tesis de Licenciatura en Biología, Universidad Central de Venezuela.

Hickman, B., Janaswamy, S., Yao, Y. 2009. Autoclave and β -Amylolysis Lead to Reduced *In Vitro* Digestibility of Starch. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57: 7005-7012.

Hizukuri, S. 1985. Relationship between the distribution of the chain length of amylopectin and the crystalline structure of starch granules. *Carbohydrate Research*, 141: 295-306.

Holm, J., Björck, I., Sjöberg, L., Lundquist, I. 1985. Starch availability *in vitro* and *in vivo* after flaking, steam-cooking and pooping of wheat. *Journal of Cereal Science*, 3: 193-206.

Holm, J., Björck, I., Drews, A., Asp, N. 1986. A rapid method for analysis of starch. *Starch*, 38: 224-226.

Hoover, R. 2001. Composition, molecular structure and physicochemical properties of tuber and root starches. *Carbohydrate Polymers*, 45: 253-267.

Hostettler, F., Borel, E., Deuel, H. 1951. Über die reduktion der 3,5 dinitrosalicylsäure durch Zucker. *Helvetica Chimica Acta*, 34: 2132-2139.

Hsu, C., Hurang, S., Chen, W., Weng, Y., Tseng, C. 2004. Qualities and antioxidant properties of bread as affected by the incorporation of yam flour in the formulation. *International Journal of Food Science and Technology*, 39: 231-238.

Huang, X., Yang, B., Hu, C., Yao, J. 2009. *In vitro* induction of inflorescence in *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 99:209-215.

Ikediyi, C., Igboanusi, L. 1983. Identification of yam *Dioscorea* spp. cultivars by use of electrophoretic patterns of soluble tuber proteins. *Biotropica*, 15:65-67.

Imberty, A., Buléon A., Tran, V., Pérez, S. 1991. Recent advances in knowledge of starch structure. *Starch*, 43: 375-384.

IPGRI/IITA. 1997. Descriptores para el ñame (*Dioscorea* spp.). Instituto Internacional de Agricultura Tropical, Ibadán, Nigeria/Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia. 64 pp.

Iriondo, J. M., Pita, J.M. 1998. Bancos de cultivo *in vitro*. *Agricultura: Revista agropecuaria*. 794: 714-715.

Ishiguro, 2000. Retrogradation of potato starch. *Starch*, 8: 12-18.

Islam, T., Keller, J., Dembele, P. 2008. Effects of growth regulators on *in vitro* propagation and tuberization of four *Dioscorea* species. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 18: 25-35.

Jackson, S.D. 2009. Plant responses to photoperiod. *New Phytologist*. 181: 517-531.

Jara, G. 1996. Propagación *in vitro* y microtuberización de cultivares de *Solanum tuberosum* L. en medios líquidos. Tesis de Magister Scientiae. Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Jayakody, L., Hoover, R. Liu, Q., Donner, E. 2007. Studies on tuber starches. II. Molecular structure, composition and physicochemical properties of yam (*Dioscorea* sp.) starches grown in Sri Lanka. *Carbohydrate Polymers*, 69:148-163.

Jean, M., Cappadocia, M. 1991. *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and 'Florido' and *D. abyssinica* Hoch. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 26: 147-152.

Jiménez, D., Hernández, R. 2009. Manual Técnico del Cultivo de ñame. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. Ciudad de Panamá. 44 pp.

Kadota, M., Niimi, Y. 2004. Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. *Scientia Horticulturae*. 102: 461-466.

Karam, L., Ferrero, C., Martino, M., Zaritzky, N., Grossmann, M. 2006. Thermal, microstructural and textural characterization of gelatinized corn, cassava and yam starch blends. *International Journal of Food Science and Technology*, 41: 805-812.

Kaur, C., Kapoor, H. 2002. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37: 153-161.

Khuri, S., Moorby, J. 1995. Investigations into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. *Annals of Botany*. 75: 295-303.

Kittipadukul P., Bethke P., Jansky S. 2012. The effect of photoperiod on tuberisation in cultivated x wild potato species hybrids. *Potato Research*, 55: 27-40.

Klu, G. 2002. Conservation of *Dioscorea rotundata*: Effect of basal medium type and naphthalene acetic acid on growth and microtuberization. *West African Journal of Applied Ecology*. 3:99-103.

Laurentin, A., Edwards, C.A. 2013. Fiber: resistant starch and oligosaccharides. En: Caballero, B. (ed.) *Encyclopedia of Human Nutrition* (3.^a ed.), p 246-253. Waltham, MA: Academic Press.

Lebot, V., Malapa, P., Molisale, T., Marchand, J.L. 2006. Physico-chemical characterization of yam (*Dioscorea alata* L.) tubers from Vanuatu. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1199-1208.

Lebot, V. 2009. Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids. CABI, Publishing, UK. 413 pp.

León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. 2^{da} edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 462 pp.

Leunufna, S., Keller, E. 2003. Investigating a new cryopreservation protocol for yams (*Dioscorea* spp.). *Plant Cell Reports*, 21: 1159–1166.

Li, M., Li, J., Liu, W., Liu, L., Lu, J., Niu, J., Liu, X., Yang, Q. 2014. A protocol for *in vitro* production of microtubers in Chinese yam (*Dioscorea opposita*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 78: 1005-1009.

Liendo, J., Perdomo, B., Techeira, N. 2011. Uso de almidón de apio (*Arracacia xanthorrhiza* B.) en colados de durazno (*Prunus persica* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía* (UCV), pp 93-104.

López, Y. 1999. Caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres de *Quassia amara* L. Ex. Blom de Centroamérica. Tesis de *Magister Scientiae*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica.

López, J., Nieto, R., Barrietos, A., Rodríguez, E., Colinas, M., Borys, M., González, F. 2008. Selección de variables morfológicas para la caracterización del tejocote (*Crataegus* spp.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 4: 97-111.

Lovera, M. 2014. Evaluación fisicoquímica y nutricional de películas comestibles a base de almidón. Trabajo de Ascenso a la categoría de Profesor Asistente. Universidad Central de Venezuela.

Mahesh, R., Muthuchelian, K., Maridass, M., Raju, G. 2010. *In vitro* propagation of wild yam, *Dioscorea wightii* through nodal cultures. International Journal of Biological Technology. 1: 111-113.

Malaurie, B., Pungu, O., Dumont, R., Trouslot, M. 1993. The creation of an *in vitro* germoplasm collection of yam (*Dioscorea* spp.) for genetic resources preservation. *Euphytica* 65: 113-122.

Malaurie, B., Trouslot, M., Berthaud, J. 1998. Conservation et échange de germoplasme chez les ignames (*Dioscorea* spp.). pp 135 - 161. In: Berthaud, J., Bricas, N., Marchand, J. (Eds). L'igname, plante séculaire et culture d'avenir. Montpellier, France.

Malaurie, B., Trouslot, M., Berthaud, J., Bousalem, M., Pinel, A., Dubern, J. 1998. Medium-term and long-term *in vitro* conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. *Electronic Journal of Biotechnology*. 1: 103-109.

Mandal, B. 2000. Cryopreservation of yams apices: a comparative study with three different techniques. pp 233–237. In: Engelmann, F., Takagi, H. (eds) Cryopreservation of tropical plant germplasm, current progress and application. IPGRI, Rome, Italy.

Mantell, S., Hugo, S. 1989. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 16: 23-37.

Marín, J. 2009. Estudio del almidón presente en frutos de variedades de musáceas cultivadas en Venezuela. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad Central de Venezuela.

Marín, E., Vargas, T.E., Oropeza, M. 2012. Variabilidad genética y anatomía foliar comparada de plantas de *Dioscorea alata* mantenidas en cultivo *in vitro*. *Interciencia*, 37: 477-483.

Martin, F. 1976. Tropical yams and their potencial. Part 3. *Dioscorea alata*. U.S.D.A. Agriculture Handbook N° 495. 44 pp.

Martín, V. 2010. Digestibilidad *in vitro* y aprovechamiento por el gorgojo de arroz de almidones de plátano, variedades hartón común, cambur negro, topocho cenizo, HH-12 y cambur 012. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.

Martínez, W. 1995. Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en investigación agrícola. *Agronomía Colombiana*, 12: 66-71.

Meaño, N., Ciarfella, A., Dorta, A. 2014. Evaluación de las propiedades químicas y funcionales del almidón nativo de Ñame Congo (*Dioscorea bulbifera* L.) para predecir sus posibles usos tecnológicos. Universidad de Oriente, Venezuela. *Saber*, 26: 182-187.

Mignouna, H., Ellis, N., Asiedu, R., Ng, Q. 1998. Analysis of genetic diversity in Guinea yams (*Dioscorea* spp) using AFLP fingerprinting. *Tropical Agriculture*, 75: 224-229.

Mignouna, H., Dansi, A., Zok, S. 2002. Morphological and isozymic diversity of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis*-*Dioscorea rotundata* complex) of Cameroon. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49: 21-29.

Mignouna, H., Abang, M., Fagbemi, S. 2003. A comparative assessment of molecular marker assays (AFLP, RAPD and SSR) for white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) germplasm characterisation. *Annals of Applied Biology*, 142: 269-276.

Ministerio del Poder Popular para la Alimentación. 2013. Hojas de balance de alimentos. Instituto Nacional de Nutrición, Caracas, Venezuela.

Montaldo, A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Segunda edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 408 pp.

Moorthy, S. 2002. Physicochemical and functional properties of tropical tuber starches. *Starch*, 54: 559-592.

Morais, M., Feste, A., Miller, R., Lifschitz, C. 1996. Effect of resistant and digestible starch on intestinal absorption of calcium, iron, and zinc in infant pigs. *Pediatric Research*, 39: 872-876.

Morales, J. 2006. Transformación genética de plantas de papa (*Solanum tuberosum* L.) con el gen que codifica para el inhibidor de cisteín proteinasas de origen humano, cistatina C. Tesis Doctoral, Universidad de Colima, México.

Muir, J., Young, G., O'Dea, K. 1994. Resistant starch: implications for health. *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*, 18: 23-32.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 475-597.

Nemorin, A., David, J., Maledon, E., Nudol, E., Dalon, J., Arnau, G. 2013. Microsatellite and flow cytometry analysis to help understand the origin of *Dioscorea alata* polyploids. *Annals of Botany*, 112: 811-819.

Niba, L., Bokanga, M., Jackson, F., Schlimme, D., Li, B. 2001. Physicochemical properties and starch granular characteristics of flour from various *Manihot esculenta* genotypes. *Journal of Food Science*, 67: 1701-1705.

Njoku, E. 1963. Seasonal periodicity in the growth and development of some forest trees in Nigeria. Observation on mature trees. *Journal of Ecology*. 51: 617-624.

Nonhlanhla, M., Yahya E. Choonara, Pradeep Kumar, Lisa C. du Toit, Mershen Govender, Sunaina Indermun, Viness Pillay. 2016. A review of the chemical modification techniques of starch. *Carbohydrate Polymers*, 5: 1-11.

Nugent, A. 2005. Health properties of resistant starch. *British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin*, 30: 27-54.

Nybom, H., Weising, K., Rotter, B. 2014. DNA fingerprint in botany: past, present, future. *Investigative Genetics*, 5: 1-35.

O'Keefe, S., Ou, J., Aufreiter, S., O'Connor, D., Sharma, S., Sepulveda, J., Fukuwatari, T., Shibata, K., Mawhinney, T. 2009. Products of the colonic microbiota mediate the effects of diet on colon cancer risk. *The Journal of Nutrition*, 139: 2044-2048.

Olivera, Y., Machado, R., Ramírez, J., del Pozo, P., Castañeda, L. 2014. Caracterización morfológica de 19 accesiones de *Brachiaria brizantha* en un suelo ácido. *Pastos y Forrajes*, 37: 138-144.

Olivier, K., Konan, K., Anike, F., Agbo, G., Dodo, H. 2012. *In vitro* induction of minitubers in yam (*Dioscorea cayenensis*- *D. rotundata* complex). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 109: 179-189.

Ondo Ovono, P., Kevers, C., Dommès, J. 2009. Effects of reducing sugar concentration on *in vitro* tuber formation and sprouting in yam (*Dioscorea cayenensis*- *D. rotundata* complex). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 99: 55-59.

Ondo Ovono, P., Kevers, C., Dommès, J. 2010. Effects of storage conditions on sprouting of microtubers of yam (*Dioscorea cayenensis*- *D. rotundata* complex). *Comptes Rendus Biologies*. 33: 28-34.

Oropeza, M., Marín, E., Royero, M., Vargas, T. E. 2006. Establecimiento de un protocolo RAPDs eficiente para plantas de ñame. *Agronomía Tropical*, 56: 601-606.

Osagie, A. 1982. Composition of lipids in *Dioscorea* tubers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 30: 993-996.

Ovono, P., Kevers, C., Dommès, J. 2010. Effects of storage conditions on sprouting of microtubers of yam (*Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex). *Comptes Rendus Biologies*, 10:10-16.

Pacheco, E., Techeira, N. 2009. Propiedades químicas y funcionales del almidón nativo y modificado de ñame (*Dioscorea alata*). *Interciencia*, 34: 280-285.

Pacheco, E., Techeira, N. 2009. Propiedades químicas y funcionales del almidón nativo y modificado de ñame (*Dioscorea alata*). *Interciencia*, 34: 280-285.

Perea, M., Buitrago, G. 2000. Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo de ñame. pp 17-33. en: Guzmán, M., Buitrago, G. Ñame: producción de semillas por Biotecnología (1^{era} edición). Universidad Nacional de Colombia. Editorial Unibiblos, Santafé de Bogotá, D.C. Colombia. pp 112.

Pérez, E., Bahnassey, Y., Breene, W.M. 1993. A simple laboratory scale method for isolation of amaranth starch. *Starch*, 45: 211-214.

Pérez E, Pacheco E. 2005. Características químicas, físicas y reológicas de la harina y el almidón nativo aislado de *Ipomoea batatas*. *Acta Científica Venezolana*, 56: 12-20.

Pérez, E., Rolland-Sabaté, A., Dufour, D., Guzmán, R., Tapia, M., Raymundez, M., Ricci, J., Guilois, S., Pontoire, B., Reynes, M., Gilbert, O. 2013. Isolated starches from yams (*Dioscorea* sp.) grown at the Venezuelan Amazons: Structure and functional properties. *Carbohydrate Polymers*, 98:650-658.

Phillips, J., Muir, J., Birkett, A., Lu, Z., Jones, G., O'Dea, K. 1995. Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. *American Society for Clinical Nutrition*, 62: 121-130.

Piqueras, A., Debergh, P. 2000. Morphogenesis in micropropagation. *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*. 1: 443-462.

Polanco, M. 2011. Caracterización morfológica y molecular de materiales de Yacón (*Smallanthus sonchifolius* Poep. & Endl) colectados en la ecoregión eje cafetero de Colombia. Maestría en Ciencias agrícolas. Universidad Nacional de Colombia. 92 pp.

Polzin, F., Sylvestre, I., Déchamp, E., Ilbert, P., Etienne, H., Engelmann, F. 2014. Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA[®]). *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 50: 210-216.

Poornima, G., Ravishankar, R. 2007. *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). *African Journal of Biotechnonology*. 6: 2348-2352.

Posso, D., Ghneim, H. 2009. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida. Protocolos de laboratorio UEG. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Los Teques, Venezuela. 17 pp.

Posthumus, A.C. 2000. Environmental factors affecting tuberization. Centre for Plant Physiological Research, Holand. pp 7.

Potter, N. 1982. Ciencia de los alimentos. Edit. Mc-Graw-Hill. México, Mex. 750 pp.

Quintero, I., Jarma, A. 2000. Escala para medir niveles de oxidación en medios de cultivo. Documento interno de trabajo. Mimeografiado. Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales. Universidad de Córdoba. Colombia.

Quintero, I., Polo, J., Jarma, A., Espitia, A. 2003. Enraizamiento *in vitro* de *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2: 51-56.

Rached, L., Vizcarrondo, C., Rincón, A., Padilla, F. 2006. Evaluación de harinas y almidones de mapuey (*Dioscorea trifida*), variedades blanco y morado. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56: 375-383.

Rai, M., Kalia, R., Singh, R., Gangola, M., Dhawan, A. 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection –An overview of recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71:133-152.

Ramírez, M., Urdaneta, A., León, S. 2002. Establecimiento *in vitro* de explantes adultos del guanabo (*Annona muricata* L.) tratados con hipoclorito de sodio. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 19: 1-8.

Reina, Y. 2012. El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Documentos de trabajo sobre economía regional. Banco de la República. Centro de Estudios Económicos Regionales (CEER). Cartagena, Colombia. 31 pp.

Rigato, S., González, A., Huarte, M. 2001. Producción de plántulas de papa a partir de técnicas combinadas de micropropagación e hidroponia para la obtención de semilla prebásica. *Revista Latinoamericana de la Papa*, 12: 110-120.

Riley, C., Wheatley, A., Asemota, H. 2006. Physicochemical characterization of starches from jamaican yams (*Dioscorea* spp.): Potential for pharmaceutical exploitations. *European Journal of Scientific Research*, 15: 207-219.

Rincón, A., Araujo, C., Carrillo, F., Martín, E. 2000. Evaluación del posible uso tecnológico de algunos tubérculos de las Dioscoreas: ñame congo (*Dioscorea bulbifera*) y mapuey (*Dioscorea trifida*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51: 286-290.

Rivera, H., Álvarez, A., Palacio, J., Barrios, D., Álvarez, D. 2011. Diversidad genética intra e interespecífica de ñame (*Dioscorea* spp.) de la región Caribe de Colombia mediante marcadores AFLP. *Acta Agronómica*, 60: 328-338.

Rivera, H., Álvarez, A., Palacio, J., Ochoa, A. 2012. Caracterización molecular de accesiones de ñame (*Dioscorea alata* L.) de la región caribe colombiana. *Revista de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Actualidad & Divulgación Científica*, 15: 323 – 330

Rodríguez, W. 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*, 11: 133-152.

Rodríguez, M., Matehus, J., Gerstl, A., Santana, M. 2008. Identificación del agente causal de una bacteriosis en ñame (*Dioscorea alata* L.). *Interciencia*, 33: 532-536.

Rodríguez-Falcón M., Bou J., Prat S. 2006. Seasonal control of tuberization in potato: conserved elements with the flowering response. *Annual Review of Plant Biology*. 57: 151-180.

Roger, P., Colonna, P. 1992. The influence of chain length on the hydrodynamic behaviour of amylose. *Carbohydrate Research*, 227: 73-83.

Royero, M., Vargas, T.E., Oropeza, M. 2007. Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata*. *Interciencia*, 32: 247-252.

Sajilata, M., Singhal, R., Kulkarni, P. 2006. Resistant Starch: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5: 1-17.

Salazar, R., Beltrán, J. 2003. Microtuberización en ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella". *Revista Colombiana de Biotecnología*. 4: 27-32.

Salisbury, F., Ross, C. 2000. Fisiología de las plantas. Tomo 3. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Ediciones Paraninfo. Madrid, España. pp 305.

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989: Molecular cloning, a laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 660 pp.

Sambrook, J., Russell, D. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Third Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 1500 pp.

Sánchez, M., Fernández, H., Esteban, C. A. 2008. Caracterización agromorfológica de cultivares de ñame (*Dioscorea* spp.) procedentes del suroccidente de Guatemala y efecto de su variabilidad como espesante de salsas caseras. Informe final. Programa universitario de investigación en alimentación y nutrición. Universidad de San Carlos de Guatemala. 90 pp.

Sánchez, N., Jiménez, V. 2010. Técnicas de conservación *in vitro* para el establecimiento de bancos de germoplasma en cultivos tropicales. *Agronomía Mesoamericana*, 21: 193-205.

Sarkar, D. 2010. Photoperiodic inhibition of potato tuberization: an update. *Plant Growth Regulation*, 62: 117-125.

Savikin-Fodulovic, K., Grubisic, D., Culafic, L., Menkovic, N., Ristic, M. 1998. Diosgenin and phytosterols content in five callus lines of *Dioscorea balcanica*. *Plant Science*. 135: 63-67.

Scott, G., Rosegrant, M., Ringler, C. 2000. Raíces y tubérculos para el siglo 21: Tendencias, proyecciones y opciones de política. Instituto Internacional de Investigación sobre Políticas Alimentarias. Washington, D.C. U.S.A. 71 pp.

Segovia, A. 1987. Efectos del potencial osmótico y la concentración de fósforo en el agua de riego sobre el crecimiento de la caña de azúcar. *Caña de azúcar*. 5: 5-16.

Sengupta, J., Mitra, G., Sharma, A. 1984. Organogenesis and tuberization in cultures of *Dioscorea floribunda*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 3: 325-331.

Shajeela, P., Mohan, V., Jesudas, L., Soris, P. 2011. Nutritional and antinutritional evaluation of wild yam (*Dioscorea* spp.). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14: 723-730.

Shin, J., Kim, S., Kwon, J., Lee, B., Sohn, J. 2004. Factors affecting the production of *in vitro* plants from the nodal pieces of Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) *Journal of Plant Biotechnology*. 6: 97-102.

Shu, Y., Ying, Y., Lin, H. 2005. Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 80: 157-161.

Slaughter L., Ellis, R., Butterworth J. 2001. An investigation of the action of porcine pancreatic α -amylase on native and gelatinised starches. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1525: 29-36.

Srichuwong, S., Sunarti, T., Mishima, T., Isono, N., Hisamatsu, M. 2005. Starches from different botanical sources. Contribution of starch structure to swelling and pasting properties. *Carbohydrate Polymers*, 62: 25-34.

Szepesi, B. 1991. Carbohidratos. pp 56-58 en: Conocimientos actuales sobre nutrición (6^{ta} ed.). Organización Panamericana de la Salud. No. 532. Washington, D. C.

Taiz, L., Zeiger, E. 2006. Plant Physiology, Fourth Edition. Sinauer Associates. Sunderland, MA. pp 764.

Tariqul, I., Uddin, R., Afroz, R., Rahman, S., Haque, M. 2011. Characterization and maintenance of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 36: 605-621.

Teixiera, P., Sangronis, E., Otero, M., Guerra, M., Hidalgo, G. 2006. Manaca, batata y ñame: posibles sustitutos del trigo en alimentos para dos etnias del Amazonas venezolano. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56(1): 77-82.

Thankappan, S., Abraham, K. 2012. Micropropagation and microtuber induction in *Dioscorea wallichii* Hook.f. *Journal of Root Crops*. 38: 109-115.

Thorne, M., Thompson, L., Jenkins, D. 1983. Factors affecting starch digestibility and the glycemic response with special reference to legumes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 38: 481-488.

Toledo, J., Espinoza, N., Golmirzaie, A. 1998. Cultivo de tejidos: Manejo de plántulas *in vitro* en la producción de semilla de papa. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. pp 16.

Torres, L. 2010. Caracterización morfológica de 37 accesiones de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) del banco de germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Tesis de Maestría en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 103 pp.

Tovar, J. 1992. Bioavailability of starch in processed legumes. Importance of physical inaccessibility and retrogradation. Tesis Doctoral. Universidad de Lund, Suecia.

Tovar, J. 1994. Natural and man-made resistant starch. *Agro-Food Industry Hi-Tech*, 5: 23-25.

Tovar, J. 2001. Métodos para la determinación del contenido de almidón resistente en los alimentos. En: Lajolo F. M., Saura-Calixto, F., Witting de Penna, E., Wenzel-Menezes, E. (eds), *Fibra Alimentaria en Iberoamérica*. Págs 143-154. Livraria Varela Ltd, São Paulo, Brasil.

Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, 6: 24-32.

Twyford, C., Mantell, S. 1996. Production of somatic embryos and plantlets from root cells of Greater Yam. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 46: 17-26.

Vaillant, V., Bade, P., Constant, C. 2005. Photoperiod affects the growth and development of yam plantlets obtained by *in vitro* propagation. *Biologia Plantarum*. 49: 355-359.

Valls, J. 1989. Caracterización morfológica, reproductiva y bioquímica de germoplasma vegetal. Curso de Tecnología de Semillas para Bancos de Germoplasma. CENARGEN, Brasilia. 23 pp.

van Munster, I., Tangerman, A., Nagengast, F. 1994. Effect of resistant starch on colonic fermentation, bile acid metabolism, and mucosal proliferation. *Digestive Diseases and Sciences*, 39: 834-842.

Vargas, P., Hernández, D. 2012. Harinas y almidones de yuca, ñame, camote y ñampí: propiedades funcionales y posibles aplicaciones en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*, 26: 37-45.

Vegas, 1984. Antracnosis en ñame (*Dioscorea* spp.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 33: 345-384.

Vélez, F., Valery, G. 1990. Plantas Alimenticias de Venezuela. Fundación Bigott. Sociedad de Ciencias Naturales la Salle. Caracas, Venezuela. 277 pp.

Villalobos, V., Thorpe, T. 1993. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados pp: 127-142. en: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicación. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.

Vizcarrondo, C. Rincón, A. Padilla, F. 2004. Caracterización del almidón nativo de *Dioscorea bulbifera* L. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54: 350-365.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.

Vuylsteke, M., Peleman, J., van Eijk, M. 2007. AFLP-based transcript profiling (cDNA-AFLP) for genome-wide expression analysis. *Nature Protocols*, 2: 1399- 1413.

Wendawek, A., Demissew, S., Fay, M., Smith, R., Nordal, I., Wilkin, P. 2013. Genetic diversity and species delimitation in the cultivated and wild Guinea yams (*Dioscorea* spp.) from Southwest Ethiopia as determined by AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 60: 1365–1375.

Willis, H., Eldridge, A., Beiseigel, J., Thomas, W., Slavin, J. 2009. Greater satiety response with resistant starch and corn bran in human subjects. *Nutritional Research*, 29: 100-105.

Wilson, A., Carlson, S., White, T. 1977. Biochemical evolution. *The Annual Review of Biochemistry*, 46: 473-639.

Wilson, A., Sarich, V., Maxson, L. 1974. The importance of gene rearrangement in evolution: evidence from studies of rates of chromosomal, protein and anatomical evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71: 3028-3030.

Wurzburg, B. 1986. Forty years of industrial starch research. *Cereal Food World*, 31: 897-903.

Xu, J., Yin, H., Wang, W., Mi, Q., Liu, X. 2009. Effects of sodium nitroprusside on callus induction and shoot regeneration in micropropagated *Dioscorea opposita*. *Plant Growth Regulation*. 59: 279-285.

Yan, H., Yang, L., Li, Y. 2011. Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 104: 193-198.

Younes, H., Coudray, C., Bellanger, J., Demigné, C., Rayssiguier, Y., Remésy, C. 2001. Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*, 86: 479-485.

Zaidul, I., Norulaini, N., Mohd, A., Yamacuchi, H., Noda, T. 2007. RVA analysis of mixtures of wheat flour and potato, sweet potato, yam, and cassava starches. *Carbohydrate Polymers*, 69: 784-791.

Zhang, G., Ao, Z., Hamaker, B. 2006. Slow digestion property of native cereal starches. *Biomacromolecules*, 7: 3252-3258.

Zobel, H. 1988. Starch crystal transformation and their industrial importance. *Starch*, 40:1-7.