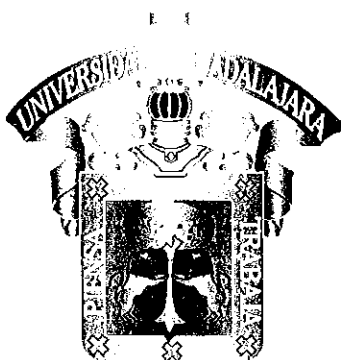


UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AGROPECUARIAS**



**MÉTODOS DE PROPAGACIÓN PARA CAMOTE DE
CERRO (*Dioscorea* spp.) COLECTADO EN EL ESTADO
DE JALISCO**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO AGRÓNOMO

P R E S E N T A:

ISMAEL ITURBE DE LOS SANTOS

GUADALAJARA, JALISCO A 30 DE MARZO DEL 2007



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERO AGRÓNOMO
COMITE DE TITULACIÓN

M.C. SALVADOR MENA MUNGUÍA
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
PRESENTE

Con toda atención nos permitimos hacer de su conocimiento, que habiendo sido aprobada la modalidad de titulación TESIS E INFORMES, opción, TESIS, con el título:

"MÉTODOS DE PROPAGACIÓN PARA PARA EL CAMOTE DE CERRO (Dioscorea spp) COLECTADO EN EL ESTADO DE JALISCO"

El cual fue presentado por él (los) pasante(s):

ISMAEL ITURBE DE LOS SANTOS

El Comité de Titulación, designó como director y asesores, respectivamente, a los profesores:

DR. FERNANDO SANTACRUZ RUVALCABA	DIRECTOR
DR. JUAN FRANCISCO CASAS SALAS	ASESOR
DR. LINO DE LA CRUZ LARIOS	ASESOR

Una vez concluido el trabajo de titulación, el Comité de Titulación designó como sinodales a los profesores:

M.C. MARTHA ISABEL TORRES MORÁN	PRESIDENTE
M.C. ADRIANA AVENDAÑO LÓPEZ	SECRETARIO
M.C. JOSÉ MIGUEL PADILLA GARCÍA	VOCAL

Se hace constar que se han cumplido los requisitos que establece la Ley Orgánica de la Universidad de Guadalajara, en lo referente a la titulación, así como el Reglamento del Comité de Titulación.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

BIBLIOTECA CUCBA

Las Agujas, Zapopan, Jal. a 30 de marzo de 2007.

M.C. SALVADOR GONZÁLEZ LUNA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

DRA. MARÍA LUISA GARCÍA SAHAGÚN
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

AGRADECIMIENTO

A mi madre:

Concepción de los Santos Reyes

Que con su esfuerzo y amor me supo orientar para llegar a la culminación de mis estudios.

A mi padre:

† Jesús Iturbe Vázquez

Por sus consejos

A mis abuelos:

Gabino de los Santos Trinidad

Por sus enseñanzas y consejos

y Antonia Reyes González

Por su comprensión y cariño

A mi hermana:

Liliana del Carmen

Por su apoyo brindado

† *Al Doctor Juan Francisco Casas Salas:*

Por todas sus enseñanzas y todo el apoyo obtenido al asesorarme para realizar mi tesis

Al Doctor Fernando Santacruz Ruvalcaba:

Por el apoyo obtenido para la realización de mi trabajo de tesis

Mi agradecimiento eterno:

Al Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara, así como el personal docente por haberme formado como profesionista.

CONTENIDO	Página
CONTENIDO	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTAS DE CUADROS	iv
RESUMEN	1
I INTRODUCCIÓN	2
1.1 Objetivo	4
1.2 Hipótesis	4
II REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Origen, historia y distribución del género <i>Dioscorea</i>	5
2.1.1. Distribución de <i>Dioscorea remotiflora</i> en México	6
2.1.2. Distribución de <i>Dioscorea nelsonii</i> en México	6
2.2 Descripción botánica	6
2.2.1. <i>Dioscorea remotiflora</i>	8
2.2.2. <i>Dioscorea nelsonii</i>	9
2.3 Aprovechamiento	9
2.4 Formas de propagación en vegetales	11
2.4.1. Reproducción asexual	11
2.4.2. Reproducción sexual	12
2.5 Manejo del cultivo	14
2.5.1. Preparación del suelo y siembra	15
2.5.2. Labores culturales	15

2.6 Determinación bromatológicas del rizoma del camote del cerro (<i>Dioscorea dugesii</i> Rob)	16
2.7 El cultivo de tejidos vegetales	17
III MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1 Preparación de los materiales	20
3.2 Propagación por semilla	20
3.2.1. Prueba de germinación de semilla en incubadora	20
3.2.2. Propagación por semilla en charola	21
3.3 Inducción de la brotación a partir de tubérculo	21
3.4 Propagación <i>in vitro</i> de los materiales	22
3.4.1. Selección por el origen del explante	22
3.4.2. Evaluación del efecto del carbón activado en el desarrollo vegetativo <i>in vitro</i> del camote del cerro.	23
IV RESULTADOS Y DISCUSIONES	24
4.1 Pruebas de germinación	24
4.1.1. Prueba de germinación de semilla en incubadora	24
4.1.2. Prueba de germinación de semilla en charola	25
4.2 Inducción de la brotación de yemas a partir de tubérculo	27
4.3 Propagación <i>in vitro</i> de los materiales	28
4.3.1. Selección por el origen del explante	29
4.3.2. Evaluación el efecto del carbón activado en el desarrollo vegetativo <i>in vitro</i> del camote de cerro	31
V CONCLUSIONES	33
VI BIBLIOGRAFÍA	34

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Prueba de germinación en semilla de <i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth en incubadora.	25
Figura 2. Prueba de germinación de semilla de <i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth, en charolas.	25
Figura 3. Plántulas de <i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth después de cuatro semanas de germinación.	26
Figura 4. Plántula de <i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth después de dos meses de germinadas.	27
Figura 5. Inducción de brotación en segmentos de tubérculo en camote de cerro (<i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth)	28
Figura 6. Inducción de brotación <i>in vitro</i> en el camote de cerro (<i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth).	30
Figura 7. Comparación de desarrollo <i>in vitro</i> de las plantas al utilizar medio con y sin carbón activado en el camote cerro (<i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth).	32

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Prueba de germinación de semillas de camote de cerro (<i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth). Utilizando una temperatura de 25 °C y sembrando 25 semillas por repetición.	24
Cuadro 2. Análisis de varianza de los tratamientos para número de brotes por explantes <i>in vitro</i> de <i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth a los 30 días, utilizando como factores tipo de explante y origen del explante.	29
Cuadro 3. Comparación múltiple de medias para número de brotes por repetición para el factor origen del explante en <i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth. Utilizando la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (DMS).	30
Cuadro 4. Comparación múltiple de medias para número de brotes por repetición para el factor origen del explante en <i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth. Utilizando la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (DMS).	30
Cuadro 5. Prueba de significancia estadística "t", para número de brotes por explantes <i>in vitro</i> de <i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth, utilizando dos medios de cultivo.	31
Cuadro 6. Comparación múltiple de medias para dos diferentes tratamientos en la producción <i>in vitro</i> de brotes en <i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth". Utilizando la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (DMS).	31

RESUMEN

En la actualidad en nuestro país se ha desatendido el estudio de muchas especies y géneros de plantas que pueden ser aprovechables. Entre ellas, podemos mencionar el género *Dioscorea* del cual muchas de las especies permanecen silvestres. El presente trabajo trata sobre la evaluación de tres diferentes metodologías (semillas, tubérculo y proliferación de yemas axilares *in vitro*) para reproducir el camote del cerro (*Dioscorea remotiflora*), a partir de colectas obtenidas en el estado de Jalisco.

Durante la investigación se realizaron experimentos encaminados a conocer la viabilidad y germinación de la semilla de *Dioscorea* encontrando porcentajes altos de germinación (91%) en charola con sustrato, después de haber transcurrido 4 años de almacenamiento.

Para la inducción de regeneración de brotes a partir de segmentos de tubérculos solo se obtuvo la estimulación de las yemas al aplicar AG_3 (0.1g/l).

Un aporte más se logró al reproducir *in vitro* de forma efectiva esta especie, por medio de proliferación de yemas axilares. Regenerando nuevos brotes a partir de seleccionar explantes sin hojas. Asimismo, la adición de carbón activado al medio de cultivo (1g/l) favorece la producción de brotes.

Con lo anteriormente señalado, al lograr la propagación por alguna de las metodologías antes descritas, se estarían dando avances firmes hacia la domesticación y manejo de la especie *Dioscorea remotiflora*.

I INTRODUCCIÓN

Existen alrededor de 800,000 especies de plantas en el mundo, de las cuales muy pocas han sido explotadas por el hombre. Solo tres especies de cereales y otras 10 diez especies más son cultivadas ampliamente, Se utilizan 250,000 ó más especies ya nombradas o descritas, con potencial para mejorar el suministro mundial de alimento o cuyos compuestos químicos y/o biológicamente activos podrían aislarse con fines medicinales (Von Reis, 1977). México es un país importante como fuente de diversidad genética vegetal, la cual radica entre otros aspectos en: a) su enorme riqueza florística con más de 30,000 especies, b) su contribución de cultivares al mundo entre 60 a 100 especies, c) poseer una de las floras más variadas de América (debido a la configuración del territorio Nacional y en cierto modo a la variabilidad de su clima y suelo, causada por la accidentada topografía y a la compleja estructura geológica del mismo). Cuevas (1989), señala que para entender la importancia de los recursos fitogenéticos, la sola presencia de una especie vegetal, no es suficiente para considerarla como recurso, es solo mediante la intervención del intelecto humano como las plantas adquieren su carácter de satisfactores de necesidades ya sean estas estrictamente fisiológicas o derivadas de su cosmovisión. Es importante destacar que gran parte de la diversidad vegetal que existe en nuestro país ha sido poco aprovechada, en especial la que ocurre en las poblaciones silvestres. Lo anterior, manifiesta la falta de un conjunto de conocimientos sobre: aprovechamiento, manejo y conservación de las especies vegetales, adquiridas a través del transcurso del tiempo, debido principalmente, a que la mayor parte de la ciencia y la tecnología generada hasta nuestros días, es enfocada principalmente al desarrollo de los cultivares actuales, lo cual no es desacertado o equivocado. En muchos de los casos, lo que se persigue es el mejoramiento genético vegetal; sin embargo, gran parte del conocimiento de las plantas que nos rodean y que nuestras etnias han generado, son desatendidos y poco explorados, siendo en consecuencia de gran importancia su rescate y el evitar que se pierdan.

Hoy en día, se ha desatendido el estudio en nuestro país de muchas especies y géneros que pueden ser aprovechables por el hombre, tal es el caso del género *Dioscorea* del cual muchas de sus especies permanecen silvestres; siendo en consecuencia necesario estudiarlas con el fin de tener elementos que en un momento dado señalen la factibilidad de introducir al menos algunas de las especies del género a un proceso de cultivo y quizás de domesticación. Lo anterior, requiere de un conocimiento amplio y preciso en torno a la variabilidad genética, la distribución geográfica, las características botánicas y las características agronómicas que posee. Asimismo, es importante conocer los usos y otras cualidades de dicho género, además de la interrelación del hombre que las utiliza y que les da la característica de recurso.

Una etapa muy importante en la domesticación y manejo de cualquier cultivo, es la propagación; ya que nos permite multiplicar los materiales seleccionados. Cuando se tiene un control total en los diversos procesos que tienen las plantas para reproducirse (formas sexuales y asexuales), entonces es factible cubrir las necesidades de las mismas para llevar a cabo su cultivo.

Por lo señalado anteriormente, es importante iniciar estudios dirigidos al conocimiento del género, ya que si en un futuro se lograra su cultivo y/o domesticación, esta planta puede constituir parte de la dieta de la población mexicana y de la humanidad en general; o bien, ser parte de la industria extractora de sustancias químicas y hormonales. Además, de frenar la extracción por parte de los pobladores y detener la erosión genética de este recurso filogenético.

1.1 OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo fue evaluar los métodos de reproducción por semilla, tubérculo y proliferación de yemas axilares *in vitro*, utilizando material vegetal de *Dioscorea* spp. colectado en el estado de Jalisco

1.2 HIPÓTESIS

La capacidad de regeneración es diferente en los métodos empleados de propagación: por semilla, tubérculo y proliferación de yemas axilares *in vitro*, en *Dioscorea* spp.

II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Origen, historia y distribución del género *Dioscorea*

El género *Dioscorea* es muy numeroso con alrededor de 650 especies distribuidas en regiones tropicales, sub-tropicales, y templadas de los cinco continentes, se han encontrado desde 0 hasta los 2,500 msnm. Según Coursey (1969) citado por Montaldo (1972), este género tuvo una amplia dispersión mundial a fines del cretácico; ocurriendo una evolución posterior y diferente, en el viejo y nuevo mundo. Como resultado, se desarrollaron en los dos hemisferios, secciones separadas del género, de las cuales ninguna esta representada en ambos. La separación de las formas ancestrales asiáticas y africanas, según el mismo autor, ocurrió más tarde en el mioceno. Existen algunas especies consideradas dentro de las más importantes como comestibles por el hombre desde hace varios siglos, particularmente *D. alata* L. y *D. bulbifera* L; ambas especies presentes en el viejo mundo (Téllez, 1987). Cerca de 100 millones de personas lo consumen en las regiones húmedas y subhúmedas de los trópicos. Es una multiespecie, generalmente poliploide que es propagada vegetativamente. *Dioscorea alata* es la especie más distribuida en el mundo (Mignouna y col., 2002).

El ñame (*Dioscorea* spp.) es una importante fuente de almidones en las regiones tropicales y subtropicales del mundo particularmente en el oeste de África, sureste de Asia, Sudamérica, en el Pacífico, el Caribe y Centroamérica. Se han descrito cerca de 600 especies de ñame y solamente siete son cultivadas ampliamente para consumirse como alimento. En el Oeste y Centro de África los ñames han sido domesticados desde hace cerca de 7000 años (Mignouna y col., 1998). En México son tres las especies más reportadas en cuanto al uso como alimentos son *D. remotiflora*, *D. dugesii* y *D. alata*.

La mayoría de especies en este género están confinadas a los trópicos en ambos hemisferios, Matuda (1954) citado por Ramírez (1990), reconoció 63 especies en México. Muchas especies del viejo mundo son plantas alimenticias de importancia comercial; los tubérculos se pueden encontrar en los mercados en América Tropical, pero menos comúnmente en el lado del Pacífico de México. En años recientes algunas especies de *Dioscorea* han sido muy

explotadas en la parte del Atlántico de México, debido a que se ha encontrado que sus raíces contienen precursores de la cortisona, una sustancia de gran valor medicinal.

2.1.1. Distribución de *D. remotiflora* en México

Según Ramírez (1990), la distribución de esta especie es amplia, pues es posible encontrarla desde el centro de México en el estado de Morelos y más al norte aún en el Estado de Sonora. Se distribuye en cañadas húmedas, pendientes de bosques, algunas veces en hábitat perturbados, al pie de las colinas o bosque subdeciduo en compañía con *Brosimum*, *Hura* y *Bursera*. Se le ha localizado entre los 100-2000 msnm. Florece entre julio y agosto, fructificando para los meses de septiembre y octubre; se ha reportado su distribución en algunos de los siguientes estados: San Luís Potosí (Río Verde), Jalisco (Guadalajara, Ameca, Talpa, Mascota, Ciudad Guzmán, Tecolotlán, Chapala, entre otros), Guanajuato, Michoacán (Morelia, Esparza y Uruapan), Colima, Oaxaca, Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Nayarit, Guerrero, Hidalgo y Zacatecas.

2.1.2. Distribución de *D. nelsonii* en México

Esta especie se encuentra en las laderas de las montañas y algunas veces en hábitat con disturbio; principalmente bosque tropical caducifolio con *Ficus*, *Hura*, *Bursera*, *Enterolobium*, o con *Ceiba*, *Stemmadenia* e *Ipomoea* arborescente; al pie de las colinas en la Vertiente del Pacífico y en los valles bajos del Río Santiago. Se ha reportado entre 300-1100 msnm, florece y fructifica de julio a octubre. Los estados en los que se le ha llegado a encontrar son: Nayarit, Jalisco, Guerrero y Chiapas (Ramírez, 1990).

2.2 Descripción botánica

El género *Dioscorea* pertenece a las monocotiledóneas y posee cerca de 600 especies, la descripción botánica del camote de cerro, según Ramírez (1990) es la que sigue:

Orden: Liliales.

Familia: Dioscoreaceas. (Número de géneros: 10; Número de especies: 630 a 650 ó más.).

Género: *Dioscorea*.

Especies: *remotiflora*, *nelsonni*, *dugesii*, entre otras en México.

Nombre común: ñame (Centroamérica), yam (África), camote de cerro (Occidente de México), barbasco (Veracruz, Tabasco).

Dioscoreaceae es una familia de plantas trepadoras, principalmente tropicales, son plantas herbáceas dioicas. Es una familia prácticamente confinada al gran género *Dioscorea*, es uno de los pocos géneros de la familia que incluye apenas 30 especies en total, únicamente *D. rajania* llega a ser también importante con cerca de 20 especies americanas. Solo el género *Dioscorea* ocurre en México. Sus tubérculos se cultivan como alimento de subsistencia, (Heywood, 1985). Planta dioica herbácea o semileñosa, brota del tubérculo o rizoma subterráneo, las hojas son alternas, enteras o lobuladas, cordadas en base, con varios pares de venas curvadas, que ascienden de la base; flores unisexuales, pequeñas, regularmente dispuestas en espigas o racimos, estas algunas veces están en un par o más flores; perianto de 6 partes; seriadas en dos, la flor estaminada es acampanulada, en roseta o tubiforme, los lóbulos desiguales, estambres 6 o 3, con tres estaminoides, o solo 3 estambres y todos perfectos, el perianto pistilado consta de 6 partes consistentes, los estaminoides diminutos 3 o 6 o sin ninguno; ovario ínfero, la mayoría de las veces alargados y 3 ángulos, trilocular, estilos 3 separados o conados; óvulos usualmente 2 en cada lóculo; los frutos usualmente con 3 alas verticales frecuentemente u ocasionalmente cápsula dehiscente, algunas veces indehiscente, elipsoide u orbicular y semillas aladas u ovoides y sin alas. Algunos Subg. de *Dioscorea* han sido tradicionalmente definidos con base a caracteres de semilla. Todas las especies pertenecientes a cualquier Subg., en los óvulos están juntos o cerca de la mitad del ovario y las semillas maduras parecen emerger mas o menos del centro. Las especies con semillas sin alas (ejemplo: *D. multinervis*, *D. minima*) fueron asignadas por Kouth al Subg. *Dioscorea* (*Eudioscorea*).

Este género es difícil para los practicantes de la taxonomía debido a que las especies son similares en apariencia y el diagnóstico de caracteres de las especies, la mayoría de las veces se debe a que las flores son muy pequeñas, las flores unisexuales, que son muy parecidas en general en forma y tamaño, difieren entre ellas en el número de estambres, número de estaminoides acompañantes (en flores de ambos sexos), la unión o pérdida de estos entre los estilos, y unos cuantos en otras formas. En la descripción, las mediciones de hojas han sido tomadas tanto como es posible del tamaño completo de las hojas caulinares debajo de las inflorescencias, en muchos especímenes de herbarios incluyen no más que las puntas de los tallos con inflorescencia en los cuales las hojas son usualmente pequeñas y frecuentemente de diferente forma. La parte subterránea de *Dioscorea* es frecuentemente larga, fresca y algunas con formas extrañas. En Nueva Galicia el nombre de camote de cerro es aplicado a las diferentes especies de *Dioscorea*, como referencia a la parte fresca subterránea de la planta (Mc Vaugh, 1987).

2.2.1. *Dioscorea remotiflora*

Tallo herbáceo o escasamente, no espinoso o desnudo, frecuentemente glabro (en tallos viejos parcialmente leñosos, las bases de las hojas endurecidas algunas veces simulan espinas de los nudos); frutos, flores y semillas diversas, flores en espigas compuestas o racimos (pseudoracimosas) flores agrupadas o cimas cortas laterales o racimosas en cada nudo, estambres 3, pedicelos filiformes, 5-12 mm de largo, perianto púrpura oscuro, rotado, 5-6 mm de ancho, los lóbulos suborbiculares o rómbicos, desiguales, estambres muy cortos, los filamentos inconspicuos, ningún estaminoide, perianto tubular largo, cilíndrico, el tubo 3 veces de largo que los lóbulos, pecíolos cortos y robustos, la mayoría de las veces cada 5 mm de largo o hojas de inflorescencias, arriba de 10-15 mm en las hojas más grandes que sustentan las espiguillas, ovario y frutos glabros o algunas veces ligeramente agrupados con tricomas ligeramente gruesos, semillas variadamente aladas, estilos unidos o separados estaminoides diversos, perianto campanulado, el tubo más corto que el erecto o lóbulos esparcidos; estaminoides 3 o 6; las alas de la semilla basales tan conocidas, estilo diferente la mayoría unidos en la

base; perianto campanulado a rotado, los lóbulos erectos, esparcidos, o recurvados a reflexos, iguales o mas largos que los tubos, semillas aladas en todos los lados en el plano alrededor localizados mas o menos en el centro del embrión; estaminoides 6; flores púrpuras (Mc Vaugh, 1987).

2.2.2. *Dioscorea nelsonii*

Las hojas debajo de la inflorescencias comúnmente 5-10 cm de ancho, cordadas; frutos 1.5-2(2.5) cm de largo. Las hojas debajo de la inflorescencias comúnmente (10) de 15-20 cm de ancho frecuentemente suborbicular; frutos 2.5-3.5 cm de largo. Algunas especies probablemente que pertenecen a *D. remotiflora* o *D. nelsonii* han sido referidas a *D. dugesii*; para la mayoría de los autores *D. dugesii* han sido separados de *D. remotiflora* y *D. nelsonii* debido a que los estambres son alternativamente largos y cortos o debido a que los segmentos externos del perianto son mas angostos que los externos. Los caracteres de los estambres son independientes, como especímenes del grupo *remotiflora-nelsonii* regularmente tienen los estambres alternadamente largos y cortos. El holotipo de *D. dugesii* es un tipo inmaduro de inflorescencia masculina, quizás atípica. Aparentemente, está no es muy diferente de *D. nelsonii*, la distinción entre especies y *D. remotiflora*, al menos en Nueva Galicia no es claro y el estudio completo requiere de estudios posteriores. Las flores masculinas en *D. nelsonii* son de pedicelos cortos o la mayoría sésiles, mientras que *D. remotiflora* ellos son "pedicelos cortos" (Mc Vaugh, 1987).

2.3 Aprovechamiento

El camote del cerro se colecta de septiembre a marzo, la extracción se realiza excavando con pico y barreta en el sitio donde se encuentra la raíz tuberosa y sacando la tierra con una lata; ya extraída la raíz, se limpia someramente de piedras o tierra y se coloca en quilliguas (canastos cilíndricos de carrizo) para su transportación. La colecta de esta especie no sigue ninguna norma en específico, sin embargo su aprovechamiento pudiera enmarcarse por la NOM-004-RECNAT-1996 (Diario Oficial de la Federación, 1996), que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el

aprovechamiento, transporte y almacenamiento de raíces y rizomas de vegetación forestal, entre los que se incluye al barbasco (*Dioscorea* spp.). La mayoría de la gente piensa en el ñame como plantas tropicales, y por lo tanto como adecuado para cultivarlo en México. Sin embargo, hay pocas especies que vienen de zonas templadas y prosperan aquí. Esta especie puede tolerar temperaturas por alrededor de 20 °C. El tubérculo es comestible y puede tener hasta 1 metro de largo y pesar 2 kilos o más si se planta en buen suelo y profundo.

Una vez que se cocina el tubérculo, tiene un sabor muy agradable con una textura harinosa cuando esta cocida al horno; es tan sabroso como una patata. Se le considera como un alimento excelente, y puesto que los ñames ahora recientemente se esta convirtiendo en un alimento mas común en Gran Bretaña, India, Colombia, se cree que tienen un potencial nutritivo y económico muy bueno.

La "raíz salvaje del ñame" se ha utilizado por centenares de años para tratar reumatismo y artritis. Chu y Figuereido (2002) reportan que la mayoría de las especies de ñames contienen cantidades grandes de esteroides, sobre todo diosgenina (precursor de la saponina en la síntesis de la progesterona). Sin los ñames, el complejo industrial no podría resolver la demanda mundial para los corticoesteroides sintéticos. Pero con ellos, los científicos pueden derivar los esteroides animales o humanos empleando un proceso bastante directo, la diosgenina proporciona cerca de 50 por ciento de la materia prima para la síntesis esteroide. Los tallos también son consumidos por el ganado en el pastoreo.

Díaz, (1976) referido por Téllez (1987), cita a las siguientes especies como útiles: *D. alata* L., de la que se utiliza el tubérculo como remedio antitumoral; *D. convolvulacea* S C H. & Ch, se reporta el uso de sus tubérculos contra abscesos y el uso de las hojas contra fiebre, la comezón y dolores de cabeza; así como diurética, contra dermatosis infecciosas, tumores y enfermedades de los ojos. Otras tres especies: *D. spiculiflora*, *D. composita* y *D. floribunda* tiene los mismos usos en esta referencia, el

rizoma se emplea contra reumas y la ciática, al igual que la *D. mexicana* S. CH. E.Y. D. W.

2.4 Formas de propagación en vegetales

Aspectos reproductivos

Las plantas se reproducen por dos mecanismos: 1) propagación asexual o vegetativa, que puede ser de varias maneras: bulbillos, brotes a partir de yemas axilares basales, hijuelos de rizoma, bulbos, tubérculos, estacas, esquejes, injertos, entre otros; y la producción de semillas a través de la reproducción sexual (Hartmann y col., 2002). En el cultivo de cualquier especie es de primordial importancia mantener la sanidad de las plantas para tener éxito, tanto durante la propagación, como en el crecimiento y almacenamiento del material vegetal. Durante el proceso para mantener esta condición es importante manipular el ambiente que rodea al vegetal tomando en cuenta factores bióticos (microorganismos, insectos, animales mayores, malezas, etc.), condiciones climáticas (temperatura, iluminación, humedad, gases, etc.) y factores edáficos (nutrición mineral, agua, suelo).

2.4.1. Reproducción asexual

Los individuos obtenidos por este tipo de reproducción constituyen un clon, y estos clones, a excepciones de mutaciones naturales, son genéticamente idénticos a la planta madre (Oronoz y col., 1983), algunas partes de las plantas, que pueden permitir la reproducción asexual son:

- **Bulbillos:** son pequeñas rosetas aéreas que se desarrollan a partir de meristemas axilares de la inflorescencia, en la base de las flores; estas pequeñas plantas, al desprenderse del pedúnculo floral, desarrollan raíces y evolucionan a plantas adultas.
- **Brotes a partir de yemas axilares basales:** son ramificaciones de meristemas axilares ubicados en la base de la planta, que dan origen a nuevas plantas que emergen de la periferia de la planta madre y producen raíces adventicias que le permiten desarrollarse de forma independiente (Arizaga y Ezcurra, 1995).

- **Hijuelos de rizoma:** las nuevas plantas se producen a partir de rizomas, los cuales crecen generalmente en un plano horizontal, paralelo a la superficie del terreno; a diferencia de las raíces, los rizomas poseen yemas en la cara superior donde se originan los hijuelos; éstos generalmente emergen a cierta distancia de la planta madre (Oronoz y col., 1983). Esta es una forma de propagación a nivel comercial ampliamente utilizada en algunas especies como el agave.
- **Bulbos:** es una estructura especializada que crece en la parte baja de algunas plantas dentro del suelo y consiste en un órgano corto, carnoso (almidonoso), con una parte basal y contiene un ápice o primordio de crecimiento, el cual muchas de las veces es un primordio floral. Ejemplo de ellos son la cebolla, tulipanes y narcisos. Son mayormente producidos por plantas monocotiledóneas.
- **Tubérculo:** es un tipo especial de tallo modificado con nodos e internodos, esta estructura funciona en el almacenamiento y también como un órgano de propagación vegetativa. Se forman agrupaciones ("ojos") de meristemas en los nodos del tubérculo. Entre las plantas que producen tubérculos se puede enumerar la papa, el camote de cerro y los caladios. Llegan a poseer la capacidad de producir tuberización, que es la formación de tubérculos a partir de estructuras similares (Hartmann y col., 2002).

2.4.2. Reproducción sexual

El ciclo sexual requiere de la producción de semillas, mediante las cuales se generan individuos que poseen características de ambos progenitores, dando lugar a una variación genética entre las plantas hijas. La reproducción sexual (fusión de los gametos masculino y femenino) ocurre en la flor; este ciclo comienza con la división celular meiótica que produce la mitad del número de juegos cromosómicos en el polen (células masculinas) y la mitad en la célula huevo dentro del saco embrionario (células femeninas); botánicamente, una semilla es un óvulo maduro que contiene un embrión que es usualmente el resultado de la fertilización sexual, cada semilla consiste en: un embrión, tejido de almacenamiento (endospermo) y una cubierta protectora externa. La mayoría de las plantas utilizadas como alimento, fibra y

ornamentales; son propagadas empleando semillas más que algún otro método de propagación. La producción de semillas de alta calidad es de primordial importancia para los propagadores, en las especies donde el costo de la semilla es usualmente menor comparado con otros tipos de reproducción.

Proceso de germinación de la semilla: Las estructuras esenciales de las semillas son: cubierta o testa, endospermo y el embrión.

- La testa, puede tener muy distintas texturas y apariencias; está formada por una capa interna y una externa de cutícula y, una o más, capas de tejido grueso que sirve de protección que bien puede ser pericarpio fusionado con una capa de aleurona en el caso de semillas de gramíneas. Estas características le confieren a la testa cierto grado de impermeabilidad al agua y a los gases. Ello le permite ejercer una influencia reguladora sobre el metabolismo.
- El endospermo tiene como función almacenar las reservas alimenticias de las semillas, que serán utilizadas una vez que de inicio el proceso de germinación de ésta, las reservas de acuerdo a la especie pueden ser principalmente: carbohidratos, lípidos y proteínas.
- El embrión es el origen de la raíz, hojas y tallo de la nueva planta, el embrión maduro de las plantas que tienen flores consiste en un eje parecido a un tallo (eje embrionario) en cuyo extremo están uno o dos cotiledones (Moreno. 2003).

El proceso de germinación de una semilla inicia con la imbibición, al hidratarse las células del embrión éstas sintetizan giberelina, que es secretada pasando por las células del endospermo. Allí actúa induciendo la hidrólisis enzimática; si la principal sustancia de reserva son carbohidratos se origina la síntesis de amilasas, el embrión obtiene glucosa de almidones principalmente amilosa, y amilopectina, que son hidrolizados por la α -amilasa y la β -amilasa para formar glucosa; si la principal sustancia de reserva son lípidos éstos se encuentran en forma de triglicéridos, su desdoblamiento ocurre mediante lipólisis de los triglicéridos para producir ácidos grasos y glicerol, el embrión lo toma en forma de sacarosa.

Durante el proceso de germinación, generalmente, la primera estructura en emerger de la semilla es la raíz del embrión llamada radícula. Esta raíz

rápidamente penetra en el suelo y permite que la planta se ancle y comience a absorber agua y nutrientes.

Los requerimientos para que una semilla germine son: a) Internos; Que este viable, que haya completado su madurez fisiológica y que este libre de latencia. b) Externos: agua, oxígeno, temperatura adecuada, en algunos casos luz y un sustrato inerte preferentemente, ya que como se menciono la semilla contiene el suficiente material de reserva hasta que la plántula es independiente de ésta.

Agua: El primer paso para que se inicie la germinación es que la semilla entre en contacto con el agua. Ésta es fundamental para que la semilla se rehidrate y exista un medio acuoso donde los procesos enzimáticos puedan llevarse a cabo.

Gases: Durante la germinación las células gastan energía. El requerimiento energético de las células vivas se mantiene generalmente por procesos de oxidación, en la presencia o ausencia de oxígeno (respiración y fermentación respectivamente). Comprenden un intercambio de gases, una liberación de bióxido de carbono en ambos casos y una entrada de oxígeno en el caso de la respiración. Por tanto, la germinación es afectada por la composición de los gases circundantes.

Temperatura: Las semillas de diferentes especies germinan bajo diferentes rangos de temperatura, a excepción de temperaturas extremosas. La sensibilidad de las especies difiere y no necesariamente a una mayor temperatura corresponde un incremento en la germinación. El efecto de la temperatura sobre las semillas es muy variado (Ortegón, 2006).

2.5 Manejo de cultivo

En nuestro país esta especie no recibe ningún manejo en el bosque; sin embargo, podría tomarse como referencia el cultivo del ñame en el cual, los recolectores normalmente dejan pequeñas porciones del tubérculo en el sitio de la recolección, de la cual rebrotan los tallos en la siguiente estación de lluvias, asegurando así su propagación.

En países como Colombia y Jamaica, el ñame es un cultivo de bajo nivel tecnológico, sembrado generalmente en asociación y que genera altos costos de mano de obra. La pérdida de peso en almacenamiento y las fallas en comercialización, inciden en los precios y la baja rentabilidad para el productor. La infraestructura de servicios en las zonas productoras es escasa. No hay centros de acopio apropiados para almacenamiento, aunque existe tecnología disponible (Morales y Vesga, 1988; Moreno y Chamorro, 1990). La comercialización de ñame es regional para consumo en fresco, aunque una parte se exporta a Estados Unidos, España y Alemania para alimento de la población latina y uso farmacológico. No hay industrias transformadoras de ñame en Colombia y las investigaciones orientadas a su valoración como materia prima agroindustrial han sido escasas (Pérez, 1990).

2.5.1. Preparación de suelo y siembra

En la producción del ñame criollo se realizan las siguientes prácticas: paso de arado, rastrilladas, preparación de hoyos y siembra; las labores de camellones y limpieza mecánica son muy poco utilizadas. La mecanización depende de la topografía del terreno, prevaleciendo el sistema semimecanizado en áreas planas o en áreas ligeramente onduladas. En los cultivos asociados no hay un patrón homogéneo sobre que cultivo se siembra primero ni sobre el tiempo para la siembra de las especies. Los arreglos del cultivo del ñame son tradicionales; la especie *Dioscorea alata* es asociada con yuca y maíz y la especie *Dioscorea rotundata* se cultiva sola o intercalada con yuca o asociada con maíz. Se ha reportado que en *Dioscorea cayensis* una especie bastante cultivada en Jamaica, el tamaño del segmento del tubérculo seleccionado para establecer y desarrollar el rebrote, está muy relacionado a la productividad de la planta; mientras mayor es el peso del segmento establecido (recomendando un tamaño de hasta 200 g), la planta generada producirá un tubérculo mayor (Sue y Wickhman, 1998).

2.5.2. Labores culturales

Consisten en la fertilización y la limpieza del cultivo, que incluye la aplicación de herbicidas y deshierbe mecánico y control de enfermedades. Los fertilizantes se aplican sin conocer la necesidad del cultivo y del suelo. Según

la clase de fertilizante; la aplicación se hace al voleo, en banda, localizado, fumigado y surcado a chorro. Los productores utilizan gallinaza, triple quince y urea; lo aplican entre el primero y el tercer mes después de la siembra. El 60% de la población utiliza maquinaria. No se utiliza riego, solo se cultiva ñame en seco. La mano de obra no es calificada y se cuenta con el aporte familiar.

En *Dioscorea remotiflora* y *D. nelsonii* su manejo es posible llevar un proceso de domesticación, tal y como ha sucedido con algunas especies de *Dioscorea* en las que se han seleccionado individuos y han sido sometidos a propagación vegetativa intensa; para posteriormente ser sometidos a selección (durante un largo tiempo) y buscar cambios morfológicos y bioquímicos principalmente a nivel de tubérculo, órgano de principal interés comercial (Mignouna y Dansi, 2003).

2.6 Determinaciones bromatológicas del rizoma del camote de cerro (*Dioscorea dugesii* Rob)

Siendo tan poca la información respecto a la biología del camote de cerro, en *D. dugesii* se reportó un análisis bromatológico de su rizoma, con la finalidad de obtener datos concretos que evidencie su importancia como fuente alternativa de alimento. Propiciando con ello su introducción al cultivo y posible domesticación (Maldonado, 1994).

Como primer paso, se sometió el rizoma a un proceso de secado a una estufa eléctrica a una temperatura de 70 °C para evitar que se desnaturalizaran las sustancias presentes en el material, el siguiente paso consistió en el molido del rizoma, el molido del rizoma se hizo con la finalidad de mezclar homogéneamente el material vegetal y facilitar las determinaciones químicas.

En base a los resultados obtenidos del análisis bromatológico del rizoma de *D. dugesii* Rob. Puede observarse claramente su contenido de: proteína 6.3%, cenizas 3.5% y calorías 4230 cal/g

ELEMENTO	CANTIDAD
AGUA	86.27 %
MATERIA SECA	13.72 %
CENIZAS	3.52 %
PROTEINAS	6.30 %
EXTRACTO ETERO (GRASAS)	0.39 %
FIBRAS CRUDA	3.43 %
SÓLIDOS SOLUBLES	6 B
pH	5.7
ACIDEZ TITULABLE	4.5 Meq.
CALORIAS	4230.84 Cal/g

B = Grados Brix. **Cal/g** = calorías por gramo. **Meq** = Mili equivalentes de ácido.

2.7 El cultivo de tejidos vegetales

Las técnicas que permiten establecer, mantener y desarrollar bajo condiciones artificiales y proporcionalmente controladas, en teoría, cualquier célula, porción de tejido y hasta una planta completa, se conocen como cultivo de tejidos vegetales. Poner en marcha un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales es relativamente barato si se compara con otras áreas de la biotecnología vegetal o biología experimental, por lo que con facilidad se podrían incorporar para realizar trabajos conjuntos con laboratorios de genética, bioquímica, fisiología, química, etc. El empleo de estas técnicas en aplicaciones agrícolas puede ser muy importante en cuatro aspectos fundamentales: La micropropagación de cultivares, la preservación de

germoplasma agronómico silvestre, el mejoramiento genético de las especies y en la industria con la producción de metabolitos.

En los últimos años las metodologías para cultivar *in vitro* células, tejidos y órganos vegetales han tenido un enorme desarrollo. Las técnicas de propagación *in vitro* tienen la ventaja de producir altos números de plantas en espacios pequeños durante cualquier época del año; asimismo, el crecimiento de las plantas propagadas *in vitro* con frecuencia es más vigoroso que el de las plantas propagadas *in vivo*, debido principalmente al rejuvenecimiento de la planta y a la obtención de plantas libres de enfermedades (George, 1993).

Desde hace 120 años aproximadamente, en las investigaciones de fisiología vegetal, se ha utilizado la técnica de cultivo de tejidos, con diferentes tipos de explantes que van desde: ápices de raíz y de tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros e inmaduros, segmentos de órganos de tallo y hoja y algunas veces ovarios, óvulos, anteras y polen (Street, 1977). En la propagación masiva *in vitro* o micropropagación se repiten eventos que se dan de manera natural, como lo son la producción de ramas y raíces; y de una manera más sobresaliente la producción de embriones. En la regeneración de las plantas, es importante considerar que en ellas se puede presentar un fenómeno llamado totipotencia; que es la capacidad de cualquier célula vegetal de producir una planta completa (Walden y Wingender, 1995; Portillo y Santacruz-Ruvalcaba, 2004).

La micropropagación puede conseguirse por tres diferentes caminos que son: la proliferación de yemas axilares, la organogénesis y la embriogénesis somática:

- a) En la proliferación de yemas axilares se promueve el desarrollo de los puntos de crecimiento ya existentes en las plantas. Esta técnica supone mantener la fidelidad genética de la descendencia con respecto a la planta madre, ya que la variación somaclonal está prácticamente ausente cuando se cultivan estructuras organizadas como meristemas y yemas, por lo que puede considerarse que este es el sistema ideal para la propagación clonal de cultivares (Pérez-Molphe y col., 1999).
- b) Durante el proceso de organogénesis se da la formación de órganos (brotes y/o raíces) en dos eventos en tiempos diferentes cada uno de

ellos, y sugiere mayor probabilidad de no perpetuarse la fidelidad clonal con respecto a la proliferación de yemas axilares.

- c) En la embriogénesis somática se produce una estructura bipolar completamente definida, es decir la aparición de una planta completa en un solo evento. La probabilidad de producirse variantes en la descendencia se supone es muy similar a la organogénesis.

El cultivo de los vegetales para el beneficio de los humanos involucra cinco actividades fundamentales que son:

- 1.- Selección de plantas (seleccionar o desarrollar tipos específicos de plantas).
- 2.- Propagación de plantas (multiplicar y preservar la calidad de las plantas).
- 3.- Producción del cultivo (desarrollo de plantas bajo condiciones controladas para la máxima producción).
- 4.- Manejo y almacenamiento del cultivo (preservar los cultivos producidos).
- 5.- Tecnología y transformación de los alimentos (transformar y preservar el vegetal para su consumo y/o uso), (Hartmann y col., 2002).

En lo que respecta al género *Dioscorea* se ha reportado la aplicación de metodologías de cultivo *in vitro* para la regeneración, por ejemplo en células cultivadas en suspensión de *Dioscorea deltoidea* en medio de cultivo MS, en la suspensión la producción de diosgenina se incrementó en 0.10 mg/g de peso seco, cuando fueron cultivadas en la luz y en un medio limitado en la cantidad de fosfato y sacarosa (Rojas y col., 1999). Células en suspensión de *Dioscorea deltoidea* (línea D-1) fueron mantenidas en cultivo semicontínuo en agitación con un alto porcentaje de desarrollo. Se demostró también, que la propagación continua de este cultivo es inestable en medio MS debido a la carencia de fósforo. (Kandarakov y col., 2000). Asimismo, se ha reportado la microtuberización tanto en cultivos en sólido (Klu y col., 2005) como en medio de cultivo líquido, utilizando la técnica de inmersión temporal (Jova y col., 2005).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación de los materiales

En el presente trabajo se empleó como material vegetal para el inicio de la propagación, segmentos de tubérculos y semillas; los tubérculos fueron colectados en el municipio de Cocula, Jalisco y se seccionaron aquellos con aproximadamente 3 cm de diámetro, para llegar a su estado de reposo (letargo); enseguida se trataron en el laboratorio con una solución de 2 g/l del fungicida Captan® durante 5 minutos. Se dejaron secar durante 3 días sobre papel periódico y posteriormente fueron llevados a almacenar, se introdujeron en sobres de papel tamaño oficio y se colocaron en anaqueles a temperatura ambiente en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, en Las Agujas, Zapopan, Jalisco.

Para el caso de las semillas, se utilizó material de una colecta de 4 años anteriores al experimento, estas fueron de Ahualulco, Jalisco; se cortaron los frutos en plantas hembras, se dejaron secar en el laboratorio y posteriormente fueron seleccionadas las semillas botánicas en base a su sanidad aparente. Las mismas se almacenaron herméticamente en botes de plástico de 250 ml de capacidad a temperatura ambiente.

3.2 Propagación por semilla

3.2.1 Prueba de germinación de semilla en incubadora

Se llevó a cabo una prueba de germinación de semillas (preliminar) de *Dioscorea remotiflora* en una cámara de incubación, con el mismo material colectado en Ahualulco, Jalisco. Empleando para ello una temperatura estable de 25 °C, las semillas fueron colocadas sobre discos de papel absorbente distribuido en cajas de petrí desechables de 100 X 15 mm en oscuridad completa, el papel se mantuvo húmedo agregando cantidades conocidas de agua destilada: 8 ml/caja al inicio y posteriormente 2 ml cada 3 días. Se evaluaron los porcentajes de germinación a diferentes fechas sobre 10 repeticiones (una repetición fue una caja de petrí con 25 semillas), reportando la última que se llevó a cabo a los 15 días después de la siembra. Se tomó

como semilla germinada, aquella que presentaba la aparición de la raíz y el hipocotilo.

3.2.2. Propagación por semilla en charola

Se llevó a cabo otra prueba de germinación con semillas de *Dioscorea remotiflora* empleando el mismo material colectado en Aqualulco. Esta se realizó en charolas de unisel de 200 cavidades las cuales se llenaron con musgo canadiense (Sunshine Mix 3 ®), se depositó una semilla por cavidad y se realizaron dos repeticiones (dos charolas). Las charolas se incubaron a temperatura ambiente (27 °C promedio) dentro del laboratorio; Las mismas se humedecieron a capacidad de campo al inicio de la prueba y se asperjaron con agua diariamente para mantener durante el mayor tiempo posible esta condición de humedad. Se evaluaron los porcentajes de germinación a los 15 días en las dos diferentes charolas.

3.3 Inducción de la brotación a partir de tubérculo

Con el propósito de tener más control sobre la rebrotación y multiplicación de los materiales *D. remotiflora* colectados en Cocula Jalisco, y almacenados, se diseñó un experimento bifactorial en el cual se evaluaron como factores: a) Tamaño del tubérculo (segmento 3 y 5 cm) y b) aplicación de ácido giberélico a una dosis de 0.1 g/l de agua de ácido giberélico (AG₃), humedeciendo a diario los segmentos de tubérculos. Se utilizó un tratamiento sin aplicación como testigo; debido a la limitante de material, se emplearon 20 repeticiones para segmentos de 3 cm y 5 repeticiones para los de 5 cm. Cabe hacer notar que previo al inicio del experimento todos los tubérculos fueron expuestos al frío durante un período corto de tiempo (72 horas a 4 °C); la anterior actividad se realizó para eliminar la dormancia de los puntos meristemáticos del tubérculo, el cual es un evento fisiológico que generalmente se presenta en este tipo de estructuras en las plantas (Hartmann y col., 2002).

El experimento de brotación se llevó a cabo dentro del Laboratorio de Cultivo de Tejidos a temperatura ambiente durante el mes de noviembre del 2004. Se realizaron evaluaciones a los 15, 30 y 60 después del inicio de la aplicación de los tratamientos, se empleo como variable de respuesta el número de yemas brotadas por tubérculo.

3.4 Propagación *in vitro* de los materiales

Considerando que la utilización de técnicas de cultivo *in vitro* puede ser una alternativa para conservar material *ex situ* por largos períodos y multiplicar los materiales colectados, se diseñaron experimentos con el objetivo en esta primera fase de iniciar con el desarrollo de un protocolo de propagación masiva por medio de la proliferación de yemas axilares; la metodología será de bastante utilidad para conservar y lograr incremento de los materiales.

Primeramente, se utilizaron como explantes semillas de *D. remotiflora* obtenidas en colecta en Ahualulco, Jalisco. Las semillas fueron desinfectadas con el siguiente procedimiento: las semillas se lavaron en jabón detergente y se eliminó el exceso de jabón con agua corriente, enseguida se sumergieron en etanol al 96% durante 30 segundos. Posteriormente, se transfirieron a una solución al 3% de hipoclorito de sodio por un tiempo de 5 minutos, finalizado el período se aplicaron tres lavados por períodos de 1 minuto cada uno en agua destilada estéril. Las semillas fueron transferidas dentro de la campana de flujo laminar a frascos de vidrio (para alimento infantil) con 25 ml del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con tapa de plástico autoclavable no hermética.

Durante el establecimiento, propagación y experimentación *in vitro*, todos los cultivos se incubaron bajo las siguientes condiciones: una temperatura de 27°C, fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad y una intensidad lumínica de 1500 luxes.

Una vez germinadas las semillas se llevaron a un medio fresco MS con 2 mg/l del regulador de crecimiento 6-benciladenina (BA) para inducir la brotación de yemas axilares.

3.4.1. Selección por el origen del explante

Un factor importante a tomar en cuenta en la propagación *in vitro* es la elección del explante, este experimento se llevó a cabo utilizando como primer factor dos tipos de explante (brote de aproximadamente 3 cm con hoja y brote de aproximadamente 3 cm sin hoja) y como segundo factor el origen del brote

(de plántulas de reciente germinación y de plantas con al menos tres transferencias *in vitro*), aleatorizando cada uno de los tratamientos.

En el experimento se empleó como medio basal el MS y se indujo la proliferación de yemas con la citocinina BA (2 mg/l); el medio de cultivo fue gelificado con 8 g/l de agar y se ajustó el pH a 5.8 ± 0.05 .

Cada tratamiento constó de cinco repeticiones y se evaluó la variable de respuesta número de brotes producidos por explante a los 30 días después de iniciado el experimento.

3.4.2. Evaluación del efecto del carbón activado en el desarrollo vegetativo *in vitro* del camote de cerro

Debido a que al estar cultivando los diferentes genotipos de plantas cuyo origen son semillas de camote de cerro establecidas *in vitro*, y en ellas se presentaba ligera oxidación en el medio de cultivo, además que en algunos de ellos se observó tendencia a la vitrificación; se realizó un ensayo en el cual se evaluaron dos diferentes tratamientos para determinar si el carbón activado corregía las anomalías anteriormente señaladas, los tratamientos empleados fueron: 1) medio de cultivo sin carbón activado y 2) medio de cultivo + 1 g/l de carbón activado. El medio basal utilizado en los dos tratamientos fue el MS, suplementado con las vitaminas L2 (Phillips y Collins, 1979), gelificado con 8 g/l de agar y ajustado a un pH de 5.8 ± 0.05 . Este ensayo fue evaluado mediante una prueba de significancia estadística de "t".

Se utilizaron 15 repeticiones (un explante por repetición) por cada tratamiento, las evaluaciones fueron llevadas a cabo cada quince días, se describió para ello el aspecto de la planta y se contabilizó el número de brotes por explante.

La variable de respuesta definida para los experimentos de propagación *in vitro* de los materiales, se evaluó con base en análisis de varianza para el diseño respectivo previamente mencionado y comparaciones múltiples de medias con la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) (Montgomery, 1991). Para los análisis estadísticos se empleó el paquete de cómputo Statgraphics Plus 4.0 (Statistical Graphics Corp.).

IV RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1 Pruebas de germinación

4.1.1. Prueba de germinación de semilla en incubadora

En la prueba de viabilidad y germinación de las semillas se encontraron buenos porcentajes de emergencia teniendo en promedio un 75 % (Cuadro 1), apareciendo las primeras semillas germinadas a los 6 días después de haberse sembrado, presentando un tipo de germinación hipogea (Figura 1). El conteo final se realizó a los 15 días, tiempo en el cual dejaron de germinar las semillas bajo esta condición. En presencia de humedad en el medio (papel absorbente en caja petri) y la temperatura constante de 25°C favoreció la germinación. Estas semillas almacenadas bajo condición ambiental en la región han permanecido con una buena viabilidad. En este caso, a pesar de estar empleando semillas en las cuales han transcurrido 4 años después de la cosecha y las cuáles se han almacenado a temperatura ambiente, en ellas se han mantenido porcentajes altos de viabilidad se reportan en el Cuadro 1, al parecer estos períodos largos de viabilidad se tiene en otras especies (Daniel y col., 1999).

Cuadro 1. Prueba de germinación de semillas de camote de cerro (*Dioscorea remotiflora* Kunth). Utilizando una temperatura de 25 °C y sembrando 25 semillas por repetición.

Repetición	No. Semillas Germinadas	% Germinación
I	22	88
II	19	76
III	18	72
IV	15	60
V	21	84
VI	22	88
VII	16	64
VIII	19	76
IX	21	84
X	16	64
Promedio % Germinación 75.6		



Figura 1. Prueba de germinación en semillas de *Dioscorea remotiflora* Kunth en incubadora.

4.1.2. Prueba de germinación de semilla en charola

En esta prueba se obtuvieron mejores porcentajes de germinación con respecto a los resultados obtenidos en incubadora, debido a que se presentó un promedio en germinación de 91% en 400 semillas establecidas (Figura 2). El incremento con respecto a las pruebas de germinación en incubadora se pudo deber al sustrato usado y al riego diario de las charolas. La temperatura promedio durante los 15 días de observación fue de 27 °C, presentando mínimas de 20 °C y máximas de 30 °C.

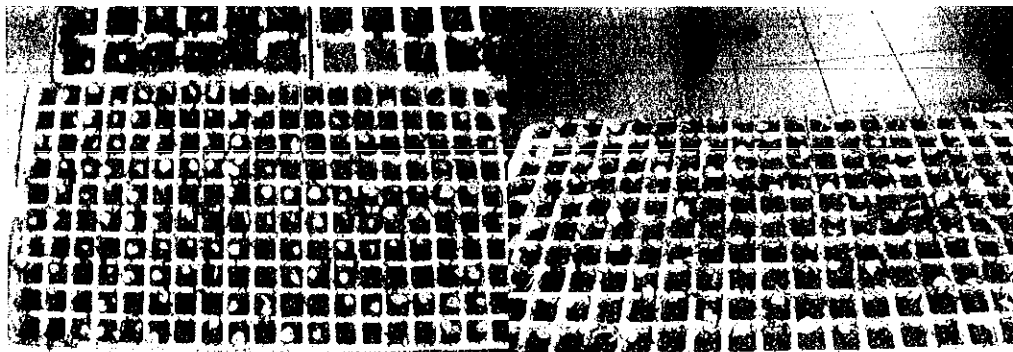


Figura 2. Prueba de germinación de semillas de *Dioscorea remotiflora* Kunth, en charolas.

Después de cuatro semanas de la germinación de la semilla, las plántulas presentaban solo una hoja (Figura 3), el tallo era delgado, debido a ello se inicio un programa de fertilización semanal para observar si emitían nuevas hojas. Una vez que se habían cumplido dos meses de iniciado el programa, en las plántulas aparecieron los tubérculos y las primeras ramificaciones aéreas (Figura 4).

Los recursos genéticos en especies de *Dioscorea* son mantenidos generalmente como material vegetativo en los bancos de germoplasma, corriendo riesgos de baja viabilidad en ellos y también son procesos más costosos, comparando con el almacenaje de semilla. Los resultados obtenidos en estas pruebas de germinación mostraron que es confiable este método de propagación y que *D. remotiflora* presenta un tipo de semilla ortodoxa (de fácil almacenamiento). Debido a lo anterior, se recomienda el almacenaje de semillas (quedando pendiente por investigar la disminución en ellas de la humedad y la reducción de la temperatura de almacenamiento; para tener una prolongada viabilidad), indispensable en la conservación del recurso (Daniel y col., 1999).

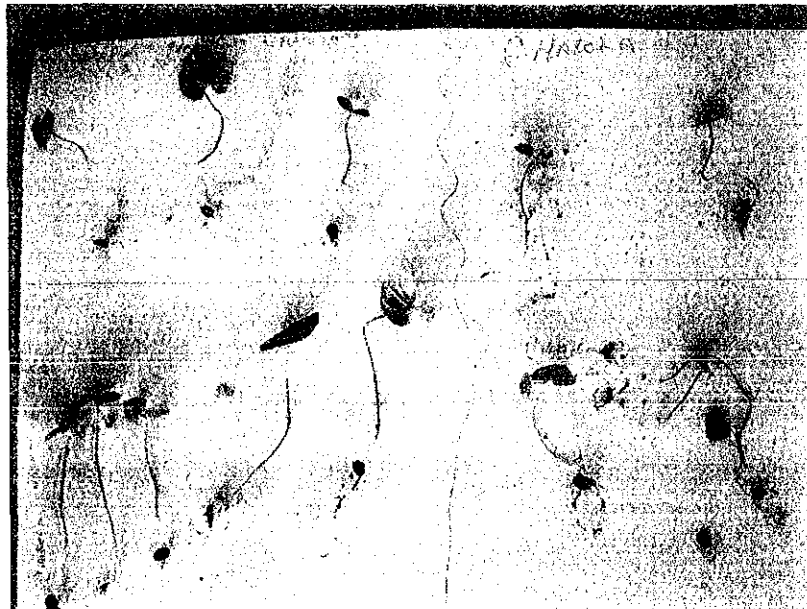


Figura 3. Plántulas de *Dioscorea remotiflora* Kunth después de cuatro semanas de germinadas.

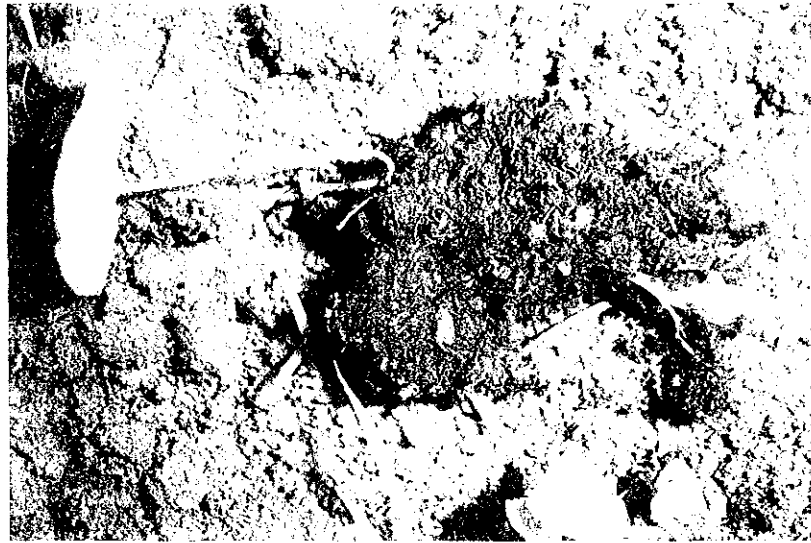


Figura 4. Plántula de *Dioscorea remotiflora* Kunth después de dos meses de germinadas.

4.2 Inducción de la brotación de yemas a partir de tubérculo

Dentro del presente experimento el ANVA no detectó significancia estadística tanto para el tamaño del tubérculo ($p = 0.677$) como para el factor aplicación de ácido giberélico ($p = 0.235$). En cuanto a observaciones, de manera general se observó la más alta iniciación de la brotación en aquellos segmentos de tubérculo que fueron asperjados diariamente con ácido giberélico independientemente del tamaño del segmento (Figura 5). En los tubérculos no tratados con ácido giberélico se presentó mínima aparición de yemas estimuladas. Lo anterior contrasta con lo observado en *D. alata* y *D. cayensis* en donde la inmersión en 150 mg de ácido giberélico por 1 hora prolongó la dormancia de los tubérculos (Tschannen y col., 2003).

Dentro de los estadios de brotación del tubérculo, Ile y col. (2006) reportan que la etapa I conocida como de iniciación del tubérculo en la estimulación de las yemas, es la más lenta y que en el caso de *D. rotundata* lleva aproximadamente 220 días. Se cree que los avances logrados con *D. remotiflora* son alentadores ya que al tratar con AG₃ si se observan cambios en los meristemas del tubérculo.

Cabe hacer mención que este experimento se diseñó y desarrolló en los meses de octubre a noviembre del 2004 a raíz de algunas observaciones realizadas en el manejo de las plantas, lo cual nos permitió solo usar tubérculos de aproximadamente 6-8 meses de efectuada la colección y ya con bastante pérdida de humedad. Se ha logrado un avance pero para tener resultados más contundentes se recomienda el uso de tubérculos de reciente colecta.



Figura 5. Inducción de brotación en segmentos de tubérculo en camote de cerro (*Dioscorea remotiflora* Kunth)

En lo que respecta al tratamiento con el fungicida no se presentaron problemas de ataque de hongos, por lo que el tratamiento empleado puede ser recomendable. Previamente se reportó tratamiento exitoso de tubérculos en la prevención de hongos fitopatógenos en *D. rotundata* y *D. alata*, especies en las que se sumergieron los segmentos de tubérculo en el fungicida benomyl o se utilizó inmersión en agua a 50 °C (Kenyon y col., 1998).

El sistema de propagación vegetativa por segmentos de tubérculo de plantas silvestres pudiera presentar limitaciones, principalmente en los tiempos largos (se requieren tres a cuatro ciclos) para alcanzar los tamaños requeridos en la propagación comercial y además de encontrar poca cantidad de tubérculos aprovechables (Chu y Figueredo, 2002)

4.3 Propagación *in vitro* de los materiales

En cuanto al establecimiento *in vitro* se logró establecer varios genotipos provenientes de semilla. El genotipo con mayor propagación fue el elegido para ser la fuente de explantes en los experimentos que se describirán a

continuación. La metodología de desinfección utilizada fue eficiente en el caso de las semillas ya que casi no existieron problemas de contaminación endógena y tampoco se modificaron las capacidades de germinación. La germinación de semillas se presentó a los 8 días y la posterior brotación en el medio de propagación empleado (2 mg/l de BA), se inicio a partir de 30 días después de la transferencia al medio de cultivo de propagación. La cantidad de brotes suficientes para establecer el primer experimento se obtuvo a los seis meses.

4.3.1. Selección por el origen del explante

El medio de cultivo utilizado con el medio basal MS adicionando 2 mg/l de BA, resultó ser el más adecuado para lograr propagar los materiales diversos de camotes de cerro. Con este medio se logró inducir brotación estimulando las yemas axilares, los brotes aparecieron a los 30 días después de la siembra de los explantes (Figura 6).

En cuanto a los resultados arrojados por el ANVA se demostró la significancia del modelo (Cuadro 2), encontrando diferencias altamente significativas tanto para el factor tipo de explante ($p = 0.000$) como para el factor origen del explante ($p = 0.000$). Presentando interacción altamente significativa ($p = 0.000$) entre ambos factores plantas sin hojas y con tres transferencias producen brotes.

Cuadro 2. Análisis de varianza de los tratamientos para número de brotes por explante *in vitro* de *Dioscorea remotiflora* Kunth a los 30 días, utilizando como factores tipo de explante y origen del explante.

FUENTE	G. L.	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PROB>F
Tipo de explante	1	6.05	34.57	0.0000**
Origen del explante	1	6.05	34.57	0.0000**
Interacción	1	6.05	34.57	0.0000**
Error	16	0.175		
Total	19			

** Altamente significativo

Al realizar la comparación múltiple de medias se observó que la producción de brotes solo se dio cuando se emplearon explantes que tenían

como origen materiales con cuando menos tres transferencias *in vitro* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Comparación múltiple de medias para número de brotes por repetición para el factor origen del explante en *Dioscorea remotiflora* Kunth. Utilizando la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (DMS).

ORIGEN DEL EXPLANTE	MEDIA (brotes/explante)	OBSERVACIONES	GRUPO
Plantas de reciente germinación	0.0	10	A
Plantas con tres transferencias	1.1	10	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. $\alpha = 0.05$

En cuanto a la selección del tipo de explante solo apareció brotación cuando se utilizaron brotes sin hojas (Cuadro 4). Se ha reportado previamente que el mejor explante para el cultivo *in vitro* por proliferación de yemas axilares es aquel que posee dos o más yemas nodales, empleando para ellos altas concentraciones de citocininas (Chu y Figueredo, 2002).

Cuadro 4. Comparación múltiple de medias para número de brotes por repetición para el factor tipo de explante en *Dioscorea remotiflora* Kunth. Utilizando la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (DMS).

TIPO DE EXPLANTE	MEDIA (brotes/explante)	OBSERVACIONES	GRUPO
Brote de 3 cm con hojas	0.0	10	A
Brote de 3 cm sin hojas	1.1	10	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. $\alpha = 0.05$

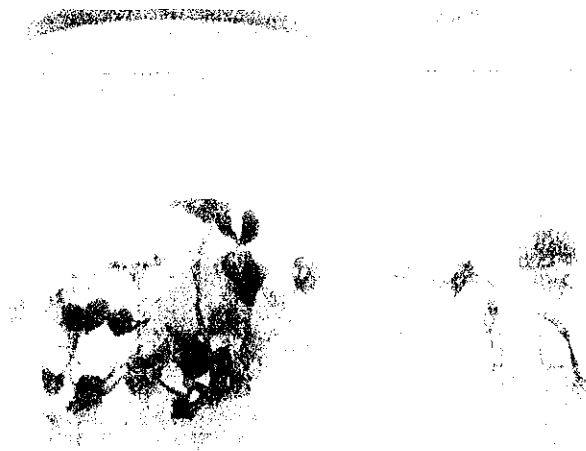


Figura 6. Inducción de brotación *in vitro* en el camote de cerro (*Dioscorea remotiflora* Kunth)

4.3.2. Evaluación del efecto del carbón activado en el desarrollo vegetativo *in vitro* del camote de cerro

En el presente experimento al ser analizado de forma estadística mediante un ANVA, para la variable producción de brotes se encontró que en las primeras dos evaluaciones ninguno de los dos medios empleados tuvo significancia, a los 20 días después de iniciado el experimento se obtuvo un valor de $p = 0.8161$; y a los 45 días el valor $p = 0.2078$. En la evaluación llevada a cabo a los 60 días se presentó significancia estadística (Cuadro 5).

Cuadro 5. Prueba de significancia estadística "t", para número de brotes por explantes *in vitro* de *Dioscorea remotiflora* Kunth, utilizando dos medios de cultivo.

FUENTE	G. L.	CUADRADO MEDIO	VALOR F	PROB>F
Tratamientos	1	37.978	5.65	0.0254*
Error	25	6.720		
Total	26			

* Estadísticamente significativo

Se realizó la comparación múltiple de medias y se observó que la mayor producción de brotes se presentó cuando se empleó el medio de cultivo MS que fue suplementado con carbón activado (Cuadro 6).

Cuadro 6. Comparación múltiple de medias para dos diferentes tratamientos en la producción *in vitro* de brotes en *Dioscorea remotiflora* Kunth. Utilizando la prueba de Diferencias Mínimas Significativas (DMS).

TRATAMIENTO	MEDIA (brotes/explante)	OBSERVACIONES	GRUPO
Medio MS sin carbón activado	8.85	14	A
Medio MS con carbón activado	11.23	13	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes. $\alpha = 0.05$

Para las evaluaciones cualitativas como la vitrificación esta se corrigió rápidamente al colocarla en el medio con carbón activado y en lo que respecta a acumulación de fenoles producto de la oxidación esta también desapareció en el tratamiento con el carbón activado. Es importante resaltar el cambio que se tuvo en la apariencia de la planta en este tratamiento de 1 g/l de carbón activado, ya que se tuvo mayor vigor (altura, hojas, tallos, etc.) y un color verde intenso en las platas tratadas (Figura 7). Borges y col. (2004), han demostrado

que en este género el carbón activado a dosis de 2 mg/l en conjunto con benciladenina (1 mg/l) y manitol 1.5%, favorecen la conservación de los materiales *in vitro* durante 9 meses sin realizar transferencias y manteniendo su potencial para su multiplicación posterior.

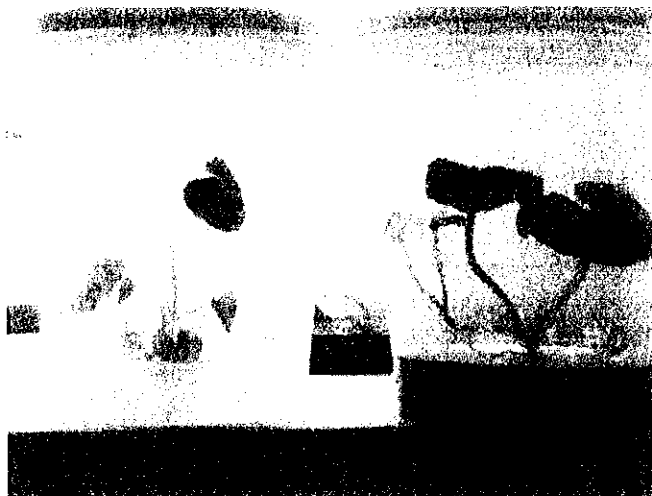


Figura 7. Comparación del desarrollo *in vitro* de las plantas, al utilizar medio con y sin carbón activado en el camote de cerro (*Dioscorea remotiflora* Kunth)

Es indispensable considerar para futuros trabajos, que la conservación y propagación del recurso genético en *Dioscorea* spp. es un aspecto de primordial importancia debido a que es la base para obtener y lograr el aprovechamiento de material vegetal de alta calidad. El Instituto Internacional de Recursos Genéticos Vegetales (IPGRI- siglas en ingles) ha marcado a este género como una planta dentro de sus prioridades. Utilizar metodologías de propagación como el cultivo *in vitro* permitiría la conservación *ex situ* del recurso y en el se pudieran tener ventajas en comparación con otros ya que en el se pueden lograr altas tasas de sobrevivencia existiendo la opción de utilizar poco número de subcultivos (Borges y col., 2004).

V CONCLUSIONES

- *Dioscorea remotiflora* Kunth, mantiene la viabilidad aún después de cuatro años de efectuarse la colecta de la semilla.
- Para el almacenamiento de este tipo de semilla, es suficiente mantenerla a temperatura ambiente. Recomendando, en futuros trabajos envasarla y mantenerla a baja temperatura en un banco de germoplasma.
- Temperaturas promedio entre 25 y 27 °C son favorables para la germinación de la semilla.
- El ácido giberélico asperjado a dosis de 0.1 g/l estimula el inicio de la brotación a partir de las yemas presentes en el tubérculo.
- Es favorable seleccionar brotes sin hojas como explantes para realizar la proliferación de yemas axilares *in vitro* en *Dioscorea remotiflora*.
- El carbón activado a una dosis de 1 g/l favorece la producción de brotes *in vitro* después de 60 días.
- Las metodologías de propagación por semilla y proliferación de yemas axilares *in vitro*, son efectivas para la multiplicación de *Dioscorea remotiflora*.

VI BIBLIOGRAFÍA

- Arizaga, S., y E. Ezcurra. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia*. 101: 329-334.
- Borges, M., W. Ceiro, S. Meneses, N. Aguilera, J. Vázquez, Z. Infante y M. Fonseca. 2004. Rgeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76: 87-90.
- Chu, E. P., y R. C. L. Figueredo. 2002. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70: 241-249
- Cuevas, S. J. A. 1989. Plantas combustibles del Totonacapan. Mimeo. Unidad de Estudios Etnobotánicos. U.A.CH. Departamento de Fitotecnia, Chapingo. México.
- Daniel, I. O., N. Q. Ng, T. O. Tayo y A. O. Togun. 1999. West African yam seeds stores under desiccated and cold storage conditions are orthodox. *Seed Sci. & Technol.* 27: 969-975.
- Diario Oficial de la Federación. 1996. Norma Oficial Mexicana, establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de raíces y rizomas de vegetación forestal. NOM-004-RECNAT-1996. México, D. F. 2 de abril de 1996.
- George, E. F. 1993. Plant propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Exegetics, Limited. England. 574 p.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. Davies y R. L. Geneve. 2002. Hartmann and Kester's plant propagation, principles and practices. Prentice Hall. U.S.A. p. 873.

- Heywood, V. H. 1985. Las plantas con flores. Ed. Reverte, S.A. Madrid, España pp. 3-13.
- Ile, E. I., P. Q. Craufurd, N. H. Battey y R. Asiedu. 2006. Phases of dormancy in yam tubers (*Dioscorea rotundata*). *Annals of Botany* 97: 497-504.
- Jova, M., R. Kosky, M. Pérez, A. Pino, V. Vega, J. Torres, A. Cabrera, M. García y J. Ventura. 2005. Production of yam microtubers using a temporary immersion system. *Plan Cell Tiss. Org. Cult.* 83: 103-107.
- Kandarakov, O., C. Titel, L. Volkova, A. Nosov y R. Ehwald. 2000. Additional phosphate stabilises uninterrupted growth of a *Dioscorea deltoidea* cell culture. *Plant Science* 157 : 209-216.
- Kenyon, L., A. Nwankitiand, E. Ekefan y J. Peters. 1998. Chemical and hot-water treatments to improve the survival of yam minisetts. *Trop. Agric.* 75: 150-151.
- Klu, G. Y. P., E. K. Asare, E. T. Blay y S. Y. C. Ng. 2005. Effect of medium type and incubation duration on improved *in vitro* tuberization in three *Dioscorea rotundata* Poir cultivars. *Plant Genetic Res. Newsletter.* 144: 24-29.
- Maldonado, G. E. 1994. Contribución al conocimiento agronómico del camote del cerro (*Dioscorea dugesii*, Robinson), germinación y bromatología. Tesis de Licenciatura . Universidad Autónoma de Chapingo. México. 71p.
- Mc Vaugh, R. 1987. Bromeliaceae to Dioscoraceae. *En: Flora Novogaliciana. A descriptive account of the vascular plants of western México . Vol. 5. The University of Michigan Herbarium, Annals of Arboretum.* pp.355-389.
- Mignouna, H. D. y A. Dansi. 2003. Yam (*Dioscorea* spp.) domestication by the Nago and Fon ethnic groups in Benin. *Genetic Res. Crop Evol.* 50: 519-528.

- Mignouna, H. D., N. T. H. Ellis, M. R. Knox, R. Asiedu y Q. N. Ng. 1998. Analysis of genetic diversity in Guinea yams (*Dioscorea* spp.) using AFLP fingerprinting. *Trop. Agric.* 75 (2): 224-229.
- Mignouna, H. D., R. A. Mank, T. H. N. Ellis, N. van de Bosch, R. Asiedu, S. Y. C. Ng y J. Peleman. 2002. A genetic linkage map of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) based on AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 105: 716-725.
- Montaldo, Á. 1972. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Lima, Perú. pp.33-39.
- Montgomery, D. C. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica, S. A. de C. V., México, D. F. 589 p.
- Morales, J. E. y L. D. Vesga, 1988. Evaluación de pérdidas de ñame bajo diferentes sistemas de almacenamiento. Tesis de Grado (Licenciatura), Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Monteiro, Argentina. 97 p.
- Moreno, C. P. 2003. Vida y Obra de granos y Semillas. Fondo de Cultura Económica. México, D. F.
- Moreno, F. y H. Chamorro. 1990. Proyecto de almacenamiento de ñame para la cooperativa de San Cayetano – Bolívar. Programa Especial de Energía de la Costa Atlántica – PESENCA. ICA. Barranquilla, Colombia. 29 p.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Pl. Physiol.* 15: 473-479.
- Ornoz, M. R., D. N. Roaro y L. I. Rodríguez. 1983. Tratado elemental de botánica. Ed. Científica Latinoamericana Larios. México.
- Ortegón, P. J. 2006. Anatomía, Morfología y Fisiología de Semillas. Curso de Fisiología de Semillas Maestría en Tecnología de Granos y Semillas. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila.

- Pérez-Molphe, E. M., R. Ramírez-Malagón, H. G. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. 179. p.
- Pérez, P. D. 1990. Determinación de parámetros para el secado de ñame. Tesis de Grado Ingeniería Agrícola. Facultad de Ingeniería, Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia. 78p.
- Phillips, G. C. y G. B. Collins. 1979. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop. Sci.* 19: 59-64.
- Portillo, L. y F. Santacruz-Ruvalcaba. 2004. Totipotencia celular: Una revisión y aplicación del concepto. *Scientia-CUCBA* 6(1-2): 13-18.
- Ramírez, R. J. R. 1990. Las dioscóreas (Dioscoreaceae) del Estado de Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. pp. 38-39.
- Rojas, R., J. Alba, I. Magaña-Plaza, F. Cruz y A. C. Ramos-Valdivia. 1999. Stimulated production of diosgenin in *Dioscorea galeottiana* cell suspension cultures by abiotic and biotic factors. *Biotechnology Letters* 21: 907-911.
- Street, H. E. 1977. *Plant Tissue and Cell Culture*. Bot. Monographs, Vol. 11. Blackwell Scientific Publications. Oxford, London.
- Sue H. C., y L. D. Wickhman. 1998. Improving traditional yam production systems: the case of yellow yams in Jamaica. *Trop. Agric.* 75 (2):252-256.
- Téllez, V. O. 1987. Las especies útiles de *Dioscorea* (Dioscoreaceae) en México. Seminario de Investigación Económica. Centro de Biología. UNAM. pp.1-11.

- Tschannen, A. B., O. Girardin, C. Nindjin, D. Daouda, Z. Farah, P. Stamp y F. Escher. 2003. GA₃ application to prolong dormancy of yam tubers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 787-796.
- Von Reis A. S. 1977. La investigación del herbario *En: Investigacion y Ciencia México, D. F.* 10: 70-78.
- Walden, R. y R. Wingender. 1995. Gene-transfer and plant-regeneration techniques. *Trends Biotechnol.* 13: 324-331.