



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Caracterización química del camote
de cerro (*Dioscorea* spp.) presente en el
Estado de Jalisco, México**

**Tesis
que para obtener el grado de**

**Doctor en Ciencias en Biosistemática,
Ecología y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

**Presenta
María de Lourdes Contreras Pacheco**

**Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba
Director**

**Dr. Jorge Alberto García Fajardo
Co-Director**

Zapopan, Jalisco

6 de junio de 2013



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Doctorado en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

“Caracterización química del camote de cerro (*Dioscorea* spp.) presente en el Estado de Jalisco, México”

Por

María de Lourdes Contreras Pacheco

Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

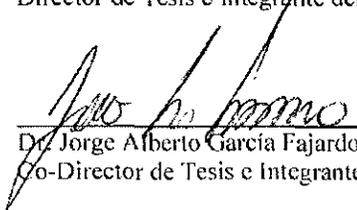
Doctor en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas

Aprobada por:



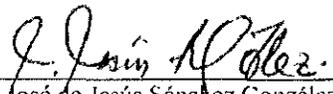
Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba
Director de Tesis e Integrante del Jurado

21-MAY-13
Fecha



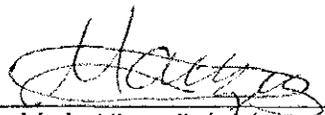
Dr. Jorge Alberto García Fajardo
Co-Director de Tesis e Integrante del Jurado

23/MAYO/2013
Fecha



Dr. José de Jesús Sánchez González
Asesor del Comité Particular e Integrante del Jurado

22/05/13
Fecha



Dr. Mario Alberto Ruíz López
Asesor del Comité Particular e Integrante del Jurado

22/05/13
Fecha



Dr. Liberato Portillo Martínez
Integrante del Jurado

22 mayo 2013
Fecha

AGRADECIMIENTOS

Con amor, admiración y respeto infinito:

A quienes jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo brindado en los buenos y malos momentos de mi vida, hago este triunfo compartido; sólo esperando que comprendan que mis ideales y esfuerzos son inspirados en cada uno de ustedes.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por brindar la beca durante los estudios de Doctorado en Ciencias a María de Lourdes Contreras Pacheco (Número de becario: 69089)

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	<i>i</i>
LISTA DE CUADROS	<i>iv</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>vi</i>
RESUMEN	<i>viii</i>
ABSTRACT	<i>ix</i>
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	
2.1 El género <i>Dioscorea</i>	4
2.1.1 Características botánicas y taxonómicas	4
2.1.2 Aspectos agronómicos	6
2.1.3 Origen y distribución geográfica	7
2.1.4 Producción mundial	9
2.1.5 Importancia y usos	10
2.1.6 Información nutricional y propiedades físicas	12
2.2 Las saponinas y sapogeninas	15
2.2.1 Estructura química, clasificación y distribución	15
2.2.2 Métodos de extracción	19
2.2.3 Métodos de identificación y cuantificación	21
2.2.4 Importancia y aplicaciones	23
2.3 Diversidad genética y la importancia de la caracterización	25
2.4 El cultivo de tejidos vegetales en <i>Dioscorea</i>	27
III HIPÓTESIS	30
IV OBJETIVOS	30

V MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Lugar de trabajo	31
5.2 Material vegetal	31
5.2.1 Establecimiento del camote de cerro en vivero	34
5.2.2 Conservación y multiplicación del material vegetal <i>in vitro</i>	34
5.3 Extracción y cuantificación de diosgenina en accesiones de camote de cerro del Estado de Jalisco	36
5.3.1 Protocolo para la extracción de diosgenina	36
5.3.2 Análisis por cromatografía de gases-masas (CG-EM)	38
5.4 Cuantificación de diosgenina en hojas de plantas de <i>Dioscorea</i> en accesiones de Jalisco	39
5.5 Características físicas y químicas de los tubérculos	40
5.5.1 Análisis físico del camote de cerro	40
5.5.2 Composición química del camote de cerro	41
5.6 Protocolo para la producción de callos <i>in vitro</i> en accesiones de <i>Dioscorea</i> del Estado de Jalisco	42
5.7 Análisis estadístico de los datos	44
VI RESULTADOS Y DISCUSIONES	
6.1 Extracción y cuantificación de diosgenina en accesiones de camote de cerro	45
6.1.1 Protocolo para la extracción de diosgenina	45
6.1.2 Análisis cromatográfico	47
6.2 Análisis de diosgenina en hojas de plantas de <i>Dioscorea</i>	52
6.3 Propiedades físicas y químicas de tubérculos de camote de cerro	54
6.3.1 Características físicas	54
6.3.2 Composición química	56
6.4 Protocolo para formación de callo <i>in vitro</i> de camote de cerro	58
6.4.1 Evaluación de los componentes del medio de cultivo,	58

reguladores de crecimiento y genotipo	
6.4.2 Efecto de los reguladores de crecimiento y el tipo de explante	60
6.4.3 Influencia de las auxinas en la generación de callos	62
VII CONCLUSIONES	66
VIII LITERATURA CITADA	68
APÉNDICE	83

ABSTRACT

Dioscorea spp. tubers are known commonly as camote de cerro to the state of Jalisco, México. Besides its use as food, it contains diosgenin, a raw material used widely for synthesizing steroid hormones. The purpose of the present research was to determine diosgenin contents by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), as well as physical and chemical characteristics of sixty *Dioscorea* spp. accessions cultivated in mesh shade coming from eleven localities in the state of Jalisco and establish a protocol for obtaining *in vitro* callus of *Dioscorea* plants. Extraction protocol for diosgenin was maceration combined with ethanol 80%. Significant statistical differences for diosgenin content were found between accessions, finding levels between 0.02 and 0.16 mg kg⁻¹ in dry basis. Length, weight tuber, proportion pulp/skin, percentage of pulp and percentage of skin showed significant differences. Chemical composition based in fresh weight presented in moisture percentage a range of 71.93–83.26 %, crude protein 1.42–1.74 %, ashes 0.80–1.16 %, lipid 0.13–0.17%, crude fibre 3.80–4.02 % and total carbohydrates 13.97–25.44 %. Results show that tubers from Jalisco can be an important source of nutrients for consumers. Is proposed a protocol for *in vitro* callus production in *Dioscorea* spp. the culture medium contains: MS basal salt with ¼ major elements and 25 gL⁻¹ of sucrose, 0.1 mgL⁻¹ of picloram and 0.4 mgL⁻¹ of indoleacetic acid as growth regulators, nodal segment were used as explants.

I INTRODUCCIÓN

En México, la combinación de numerosos climas, la diversidad florística nativa y la presencia de grupos humanos desde hace más de 30,000 años, han favorecido la evolución de las plantas, el endemismo y la domesticación de varias especies vegetales. A la fecha, las especies autóctonas de interés antropocéntrico registradas en las estadísticas agrícolas nacionales son 50 (maíz, frijol, cacao, chile, amaranto, etc.) de las cuales 24 corresponden a cultivos anuales y 26 a plantas perennes. Este grupo de por sí amplio, no incluye numerosas especies con valor de uso en las comunidades rurales. (Molina y Córdova, 2006). Las raíces y tubérculos figuran entre los alimentos humanos más antiguos y de gran importancia nutricional, ecológica y económica. En muchos países tropicales, el empleo de varios tubérculos y raíces juega un papel muy importante como fuente principal de energía y nutrientes esenciales a bajo costo, forraje e ingresos en efectivo (Poot-Matu *et al.*, 2000). Scott *et al.* (2000) sugieren que para el 2020, más de 2 mil millones de personas de Asia, África y América Latina dependerán de estos cultivos como fuente contribuyente de alimentos.

Una planta de importancia agronómica y que puede ser alternativa de cultivo en nuestro país es el camote del cerro, nombre dado al tubérculo de las especies del género *Dioscorea* en el estado de Jalisco. Dicho género es base de la alimentación en poblaciones de África, Asia y América Tropical y a nivel mundial, es el cuarto cultivo más importante de las raíces y tubérculos después de la papa, la yuca y el camote dulce (Mignouna y Dansi, 2003). Más de 600 especies existen alrededor del mundo y se le conoce también como yam o ñame. En México, existen entre 60 y 80 especies de *Dioscorea*, las cuales no se cultivan y son obtenidas solamente por colecta, ya que se desarrollan generalmente de forma silvestre (Mc Vaugh, 1989). En el estado de Jalisco, esta importante planta está localizada en las áreas montañosas, en donde los tubérculos son difíciles de colectar y la sobre-explotación ha llevado a disminuir las poblaciones naturales (Mostul y Cházaro, 1996).

Algunas especies de *Dioscorea* de México, han sido evaluadas por la presencia de saponinas esteroidales en sus tubérculos (Sautour *et al.*, 2007), mismas que al hidrolizarlas producen una sapogenina conocida como diosgenina, compuesto de gran importancia como materia prima para la producción de hormonas esteroidales y como complemento en la medicina tradicional.

Existen diferentes especies y cultivares de *Dioscorea* en el mundo, en las cuales se han realizado estudios para determinar las diferencias entre las accesiones y se ha encontrado que a pesar de mostrar morfotipos similares, éstas pueden diferir en aspectos bioquímicos o fisiológicos (Akoroda, 1983; Mignouna *et al.*, 2007; Mwirigi *et al.*, 2009). Se ha reportado que los tubérculos de *Dioscorea* spp., en general contienen aproximadamente 67–84 % de agua, 2.0–4.5 % de proteínas, 0.1–0.5 % de lípidos, 13–27 % de carbohidratos y 0.9–1.5 % cenizas (Nagai *et al.*, 2006). En Jalisco, el camote del cerro es una fuente importante de alimento e ingreso para la población rural, pero hasta ahora solamente se han realizado estudios en términos de taxonomía, ecología y fenología (Mostul y Cházaro, 1996), pero no se tiene conocimiento de la composición química de los tubérculos que se consumen en las diferentes regiones.

En los últimos años, el desarrollo de la llamada agricultura moderna ha relegado y marginado la expansión de estas especies vegetales debido a que las prioridades en la producción de alimentos han sido orientadas a los cereales, además, en comparación con otros cultivos básicos importantes como la yuca, el maíz, el arroz y el sorgo, las especies del género *Dioscorea* han sido poco investigadas (Mwirigi *et al.*, 2009). Por lo tanto, la caracterización química es importante ya que permite conocer, conservar y utilizar de forma racional los recursos fitogenéticos tanto para el desarrollo de nuevos cultivares a través de mejoramiento genético, como en la producción de alimentos y otros bienes de origen vegetal dándoles a la vez valor ético y económico (Burlingame *et al.*, 2009).

Debido a su actividad biológica, los metabolitos secundarios de las plantas, como la diosgenina, han sido utilizados por cientos de años en la medicina tradicional. Actualmente, en países occidentales el 25 % de las moléculas usadas

en la industria farmacéutica provienen de las plantas, pero debido a que muchas de ellas no desarrollan fuera de su ecosistema, la ciencia junto con la biotecnología han considerado el cultivo de tejidos vegetales como una forma alternativa de producir los metabolitos secundarios de interés industrial, principalmente farmacéutica y de alimentos (Bourgau *et al.*, 2001).

II ANTECEDENTES

2.1 El género *Dioscorea*

2.1.1 Características botánicas y taxonómicas

El género *Dioscorea* es una planta monocotiledónea, que presenta algunas características de las dicotiledóneas; de tallo rizomatoso subterráneo con tendencia a mantenerse perenne y tallo aéreo herbáceo y trepador que busca apoyo en árboles y arbustos hasta alcanzar varios metros de longitud, el cual se enrolla a la izquierda o derecha según la especie. Puede ser alado, con espinas o sin espinas, pubescente o no pubescente y circular, rectangular o poligonal en la sección transversal (León, 1987). Sus hojas son de tamaño mediano, largamente pecioladas y de forma acorazonada; se disponen de manera opuesta y/o alterna en la misma planta. Las flores regulares, pequeñas bisexuales o unisexuales, dioicas, axilares o dispuestas en panículas, espigas o racimos; las flores masculinas se encuentran en gran número sobre panojas, constan de un cáliz con tres sépalos y una corola con tres pétalos; normalmente presentan verticilos cada uno con dos estambres. El fruto proviene de la flor en forma de cápsulas triloculares, secas y transparentes, las semillas son pequeñas, aplanadas y de color claro (Mc Vaugh, 1989).

Algunas especies de *Dioscorea* producen bulbillos (tubérculos aéreos) mientras que otras forman tubérculos subterráneos de formas que van desde casi esférico hasta completamente irregulares, de color y tamaño variable dependiendo de la especie y las condiciones ambientales (Álvarez, 2000). El tubérculo está formado por la cabeza, el cuerpo y la cola, presenta raíces adventicias y una estructura llamada cormo. El tubérculo crece por un meristemo apical, generalmente con geotropismo negativo. Está cubierto por una corteza corchosa, derivada de un felógeno que permanece activo aún después de que se cosecha. Debajo de la corteza se halla la zona cortical, formada por parénquima con bajo contenido de almidón e inmediata la zona de meristemas del que derivan las yemas. La mayor porción del tubérculo la ocupa el cilíndrico central, formado por

parénquima rico en almidón, hay haces vasculares numerosos, que aparecen rodeados de parénquima menos denso, por lo que se destacan como áreas más claras en un corte transversal del tubérculo. Hay además fibras, cristales de oxalato de calcio y canales de mucílago y en algunas especies aparecen áreas con antocianinas que le dan un color morado a la pulpa, en donde el color básico de ésta varía del blanco al amarillo (León, 1987).

Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2007) la ubicación taxonómica de las especies de *Dioscorea* es la siguiente:

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Subclase	<i>Liliidae</i>
Orden	<i>Dioscoreales</i>
Familia	Dioscoreaceae
Género	<i>Dioscorea</i> L.
Especie	varias

La denominación por Carlos Linneo del género *Dioscorea*, constituye un merecido tributo a un destacado botánico y médico griego nacido hace casi dos mil años, llamado Pedaneo Dioscórides o Dioscórides de Anazarbos, que sirvió en el ejército romano en tiempos de Nerón (siglo I) y quien escribió la primera farmacopea sistemática donde precisa descripciones de más de 600 plantas (Vázquez, 2004).

2.1.2 Aspectos agronómicos

Las especies de *Dioscorea* crecen en diversos climas como bosque lluvioso tropical, monzón tropical y sabana tropical con unas cuantas especies en zonas templadas. El crecimiento de estas plantas está severamente restringido a temperaturas inferiores a los 20 °C al requerir temperaturas en el intervalo de 25 a 30 °C para exhibir un desarrollo normal; se adapta a periodos secos y puede sobrevivir bajo condiciones de déficit hídrico mejor que muchos otros cultivos; sin embargo, se ha demostrado que un déficit hídrico al inicio del ciclo de crecimiento de la planta reduce su producción y pospone el inicio de la tuberización (Rodríguez, 2000). El crecimiento también es afectado por la duración del día. Aunque los días de más de doce horas favorecen el crecimiento de los tallos y las hojas, una tuberización satisfactoria únicamente ocurre cuando los días son más cortos (Coursey, 1967). Son comunes en regiones inferiores a los 2,000 m de altitud, sin embargo, algunas especies sudamericanas alcanzan los 4,000 msnm (Ramírez y Téllez, 1992). Los mejores rendimientos se obtienen en suelos francos, orgánicos, profundos y fértiles, que estén bien drenados y bien manejados. Toleran un amplio intervalo de valores de pH, con un óptimo entre 5 y 6 (Montaldo, 1983).

De manera similar a la papa, las dioscoreas se pueden propagar asexualmente por medio de tubérculos enteros o secciones transversales que contengan yemas y que brotan después de un periodo de latencia. Si se planta el tubérculo entero, las yemas aparecen en la parte basal; cuando se siembra secciones de tubérculo en todas brotan yemas, sólo que la brotación es más rápida en la región de la cabeza (apical) y en la sección central. Las yemas se derivan de una capa meristemática situada debajo de la corteza del tubérculo; cuando salen aparecen como masas blancas de crecimiento rápido, que se transforman en cormos del que se forman los tallos aéreos, raíces y tubérculos (León, 1987). El tubérculo es el órgano de almacenamiento que permite a la planta continuar indefinidamente su crecimiento. Las sustancias de reserva, elaboradas en el follaje, son acumuladas en el tubérculo.

La recolección del tubérculo, que es la parte económicamente más importante de la planta, se lleva a cabo después de los 8 a 10 meses, induciendo de manera involuntaria al cultivo de la misma porque al excavar y remover la tierra alrededor del tubérculo, se corta la porción inferior, dejando la parte superior o la cabeza. La planta se deja crecer hasta el final de la temporada para la segunda cosecha, lo que propicia un incremento en la productividad de la especie recolectada (Opara, 2003).

En el centro y occidente de África, en donde el cultivo de estas especies es una actividad común, los tubérculos son plantados entre febrero y abril, dependiendo si es en bosque húmedo o en la sabana y son cosechadas 180 a 270 días después. Durante la cosecha, se trata de minimizar el daño de los tubérculos que conduzca a la putrefacción y a una disminución del valor comercial. Los tubérculos cosechados normalmente permanecen inactivos (no brotan) durante 30 a 120 días dependiendo de las condiciones ambientales, la fecha de cosecha y la especie. Esto significa que en estos países, sólo un ciclo de cultivo es posible al año (IITA, 2012).

En Jalisco, el camote del cerro se colecta de septiembre a marzo. La recolección se realiza excavando con un pico y barreta el sitio donde se encuentra el tubérculo y sacando la tierra de forma manual, ya obtenido el tubérculo, se limpia someramente de piedras o tierra y se coloca en 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, 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.).

2.1.3 Origen y distribución geográfica

En un estudio realizado por Téllez (2009), se menciona que en la actualidad la familia Dioscoreaceae sólo está formada por el género *Dioscorea* y que ahora

solamente se reconocen alrededor de 350 a 400 especies, quedando *Borderea* Miegév., *Epipetrum* Phil., *Nanarepenta* Matuda, *Rajania* L., *Tamus* L. y *Testudinaria* Salisb., incluidos como sinónimos de *Dioscorea*. También menciona que las especies de *Dioscorea* están agrupadas en alrededor de 70-75 secciones, en donde, 25-30 pertenecen al subgénero *Helmia* y alrededor de 45-50 al subgénero *Dioscorea*.

Con una distribución pantropical, se tiene conocimiento que estas plantas fueron domesticadas aproximadamente hace 10,000 años, siendo después de la calabaza y la cebada, uno de los cultivos domesticados más antiguos (Harlan, 1992). Las especies de *Dioscorea*, que son de importancia económica, se presentan en tres regiones principales del mundo, representando a tres centros independientes de diversidad y/o domesticación: América Tropical (*D. trifida*), África Occidental (*D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. dumertorum*) y al Sudeste Asiático (*D. alata*, *D. esculenta*), en donde *D. bulbifera* aparece tanto en África como en Asia. *D. alata* es la única especie sin representación silvestre en el mundo entero y es la más ampliamente distribuida (Zannou *et al.*, 2009).

Actualmente, las especies de *Dioscorea* son cultivadas en África, Asia, parte de Sudamérica, en el Caribe y las islas del Pacífico Sur, así como en muchas otras regiones del mundo (Asiedu y Sartie, 2010), se les conoce popularmente como batata, camote blanco, hualacamote, ñame en español o yam en inglés y las podemos encontrar también en forma silvestre en las regiones lluviosas de los trópicos, aunque también se encuentran en áreas subtropicales y en las templadas.

En México, podemos encontrar 74 especies (Téllez, 2009) de las cuales 40 son endémicas con algunos tubérculos comestibles (Téllez, 1996). Dos especies de importancia económica para nuestro país son: *D. compositae* y *D. mexicana*. La primera, denominada popularmente “barbasco”, es una planta de origen norte y mesoamericano, mientras que *D. mexicana* es nativa de México y Mesoamérica. Existe un número de especies de distribución restringida que han sido menos colectadas y que como consecuencia se conoce poco de ellas (Téllez, 2009), por

ejemplo: *D. insignis*, endémica de Guerrero y Oaxaca, *D. nematodes*, endémica de Guanajuato, *D. temascaltepecensis*, endémica del Estado de México entre otras. Su distribución conocida, es desde Sinaloa hasta Chiapas por el Pacífico, de Tamaulipas a la Península de Yucatán por el Golfo de México y de Chihuahua hasta Puebla y Querétaro por el centro (Ramírez y Téllez, 1992).

En Jalisco se le da el nombre de camote de cerro a los tubérculos de especies de *Dioscorea* que crecen de manera silvestre y cuya extracción genera un alto grado de dificultad. *D. remotiflora* Kunth y *D. sparsiflora* Hemsley son algunas de las especies endémicas de México que podemos encontrar en las zonas montañosas de Jalisco.

2.1.4 Producción mundial

De acuerdo al International Institute of Tropical Agriculture (IITA), la producción mundial de yam para el 2007 aumentó a 52 millones de toneladas, de la cual África provee el 96 %. La mayor parte de la producción proviene de África Occidental (94 %) siendo los países de mayor producción Nigeria y Costa de Marfil. En términos de área cosechada, 4.6 millones de hectáreas fueron plantadas a nivel mundial en 2007, en donde, 4.3 millones provienen del centro y occidente de África. Mientras tanto, en América la producción anual del 2007 fue de 1.28 millones de toneladas, destacando como productores Colombia, Brasil, Cuba y Haití (FAOSTAT, 2012). Para México en particular, no existen datos estadísticos.

Actualmente, las especies de *Dioscorea* comestibles y de valor comercial son: el ñame blanco (*D. rotundata*), el ñame amarillo (*D. cayenensis*), el trifoliado (*D. dumertorum*), el ñame de agua (*D. alata*) y el chino (*D. esculenta*), el ñame aéreo (*D. bulbifera*), que ocurre tanto en África como en Asia y hasta el momento las únicas especies originarias de América son *D. trifida*, *D. compositae* y *D. mexicana* (Coursey, 1967; Hahn, 1995). *D. rotundata* y *D. alata*, son las especies más cultivada en el mundo (IITA, 2012).

La producción del yam está disminuyendo en algunas zonas productoras tradicionales debido a la disminución de la fertilidad del suelo, aumento de la presencia de plagas y el alto costo de mano de obra. Los pequeños productores por lo tanto, necesitan tener acceso a las innovaciones para reducir el trabajo y mejorar la productividad.

2.1.5 Importancia y usos

En los países tropicales, las raíces y tubérculos son el segundo grupo de especies cultivadas después de los cereales. Se producen con pocos insumos y son consumidos por los más pobres, contribuyendo con la seguridad alimentaria de los países en desarrollo. Según Scott *et al.* (2000), las raíces y tubérculos proporcionan más del 6 % de la energía alimentaria a nivel mundial.

De todas las especies que conforman el género *Dioscorea*, al menos 24 se cultivan para emplearse como alimento, otras 12 se utilizan para la obtención de drogas y otras 26 siguen siendo objeto de recolección para fines ornamentales o de ganadería (Evans, 1993). La especies de *Dioscorea* son, después de la yuca y el camote dulce, los cultivos tropicales más importantes ya que constituyen la principal fuente de calorías para muchos de los pobladores del occidente de África, el sudeste Asiático y el Caribe (Mignouna *et al.*, 2007), es fuente de empleo e ingresos de los pequeños y medianos productores de las zonas rurales y juegan un papel importante en la vida sociocultural de los mismos; desde tiempos remotos se realiza anualmente en diferentes regiones del mundo el festival del Nuevo Yam (Asiedu y Sartie, 2010). Su sabor es parecido al de la papa dulce o batata (Huang *et al.*, 2007), se consume hervido, asado o frito y se utiliza para la elaboración de harina para la preparación de atoles, purés, sopas o pastas. Además, debido a los periodos relativamente largos de latencia de los tubérculos de *Dioscorea*, éstos pueden ser almacenados hasta por 6 meses a temperatura ambiente sin cambios significativos en sus propiedades nutricionales, asegurando también la disposición del tubérculo fresco en el periodo anual de escasez al inicio de las lluvias (Lebot, 2009).

Muchas especies del género *Dioscorea* contienen saponinas, sapogeninas como la diosgenina y alcaloides, que son utilizados como materia prima en la industria farmacéutica para la síntesis de esteroides entre otros productos (Asiedu y Sartie, 2010). Los tubérculos de estas plantas también son usados como complemento en la medicina tradicional para el tratamiento de la indigestión, anorexia, diarrea y diabetes. Además, tienen efecto hipoglicémico y promueven la salud de las mujeres en la tercera edad. Por la presencia de compuestos antioxidantes, los tubérculos, así como sus extractos y harinas, son recomendados para minimizar el daño y las enfermedades causadas por procesos oxidativos como el envejecimiento, el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y el mal de Alzheimer. Se le ha encontrado efecto antiinflamatorio, antirreumático, inmunorregulatorio, gastroprotector, anti-osteoporótico y antifúngico (Sautour *et al.*, 2007; Raju y Metha, 2009; Cronin y Draelos, 2010). También se ha utilizado para la producción de alcohol, veneno para flechas, como insecticida para piojos; sus bejucos se han utilizado para la elaboración de cuerdas; su follaje se ha empleado como alimento para aves de corral y el ganado, (Harlan, 1992; Opara, 2003) y otras especies tienen uso ornamental como *D. batatas*, *D. elephantipes* y *D. sansiberensis* (Waizel-Bucay, 2009).

En México, los aztecas utilizaban cataplasmas de tubérculos de *Disocorea* para tratar la sarna y los forúnculos de la piel. En 1960, las dioscoreas silvestres de México fueron la primera fuente de material utilizado para la síntesis de progesterona, andrógenos y cortisona, recientemente su producción sintética ha minimizado la importancia de estas especies como fuente principal. En la actualidad, en Jalisco se explotan de forma silvestre dos especies de camote de cerro, *D. remotiflora* y *D. sparsiflora*, cuyos tubérculos recolectados se venden de forma cruda o cocidos y son consumidos acompañados de sal, limón y chile (Mostul y Cházaro, 1996; Guízar *et al.*, 2008).

2.1.6 Información nutricional y propiedades físicas

Gran parte de los productores más pobres del mundo en desarrollo y de los hogares más desnutridos, dependen de las raíces y tubérculos como una fuente contribuyente —sino principal— de alimentos y nutrición. Las raíces y tubérculos producen cantidades notables de energía, incluso en comparación con los cereales, en donde la papa se sitúa como líder seguida del yam (Scott *et al*, 2000).

Además de sus agradables cualidades organolépticas, como sabor, olor, color y textura, los tubérculos de *Dioscorea* son una excelente fuente de carbohidratos, energía, fibra, vitaminas (especialmente vitamina C), minerales y proteínas; son bajas en vitamina A, pero pueden tener cantidades importantes de aminoácidos esenciales como la isoleucina y aquellos que contienen azufre. También la composición química del yam se caracteriza por su alto contenido de humedad. El consumo medio per cápita de yam en las principales regiones de mayor producción va de 0.5 a 1.0 kg por día proporcionando más de 350 calorías a cada persona (Mignouna *et al.*, 2007). Osunde (2008), afirma que el contenido de nutrientes varía con la especie y el procedimiento de cocción y que el contenido de azúcares y proteínas está influenciado por la variedad, la localidad y el manejo que se le dé a la planta, la madurez y el periodo de almacenamiento. En el Cuadro 1 se muestra de manera general la composición nutrimental de la porción comestible del yam.

Según Guízar *et al.* (2008), los tubérculos de *D. remotiflora* y *D. sparsiflora* y sus almidones puede llegar a tener mayor calidad nutrimental que la papa. Además, sus almidones presentan mayores rendimientos que *D. esculenta* y *D. alata*, y al igual que la papa y el chinchayote, tiene buenas características para utilizarse en la industria alimenticia.

Cuadro 1. Composición nutrimental del yam en 100 g de porción comestible.

Nutriente	Rango
Calorías (Kcal)	71-135
Humedad (%)	65-81
Proteína (g)	1.4-3.5
Grasa (g)	0.2-0.4
Carbohidratos (g)	16.4-31.8
Fibra (g)	0.40-10.0
Cenizas (g)	0.6-1.7
Calcio (mg)	12-69
Fósforo (mg)	17-61
Hierro (mg)	0.7-5.2
Sodio (mg)	8.0-12.0
Potasio (mg)	294.0-397.0
Ácido ascórbico (mg)	4.0-18.0
Niacina (mg)	0.30-0.809
Riboflavina (mg)	0.01-0.04
Tiamina (mg)	0.01-0.11
β -caroteno (mg)	0.0-10.0

Fuente: Osunde, 2008.

A pesar del bajo contenido de grasa en las dioscoreas, estudios realizados por Muzac-Tucker *et al.* (1993), Opute y Osagie (1978) y Ye *et al.* (2010) demostraron la presencia de ácidos grasos insaturados en diferentes especies de *Dioscorea* con la detección del ácido linoléico y ácido linolénico, así como de otros fitoesteroles como el campesterol, estigmasterol y β -sitosterol, que han sido reportados por Lin y Yang (2008).

Otra característica importante de las especies de *Dioscorea* es que contienen pequeñas cantidades de compuestos polifenólicos como taninos, antocianinas, catequinas, entre otros, que contribuyen de manera importante en el

sabor, color y propiedades antioxidantes de los tubérculos. Estos compuestos fenólicos son también responsables de que los tubérculos de *Dioscorea* presenten reacciones enzimáticas de oscurecimiento al ser cortados y expuestos al aire (Bhandari *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2008; Ramos *et al.*, 2010). Las especies de *Dioscorea* contienen saponinas y sapogeninas esteroidales y algunas contienen alcaloides como la dioscorina y derivados de esteroides, los cuales hacen que el tubérculo tenga un sabor amargo y en ocasiones sea venenoso si se consumen sin el tratamiento adecuado (Mignouna *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008).

Muchos alimentos, incluyendo las raíces y tubérculos, no pueden ser digeridos y por lo tanto consumidos en su forma natural, por lo que requieren de procesos de cocción que incrementan la palatabilidad, la asimilación adecuada de nutrientes y la eliminación de sustancias que pudiesen ser potencialmente tóxicas. Estas sustancias llamadas antinutricionales están conformadas por los compuestos fenólicos, taninos, cianuro de hidrógeno, oxalatos e inhibidores de amilasa y de tripsina. Shanthakumari *et al.* (2008) y Shajeela *et al.* (2011), hicieron una evaluación de los factores antinutricionales de diferentes especies silvestres de *Dioscorea* y sugirieron los métodos adecuados para hacer de los tubérculos una fuente de alimento confiable.

El tamaño del tubérculo y la forma son diferentes, dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo, puede variar desde unos pocos centímetros y gramos, hasta 2 a 3 m y más de 50 kg (Opara, 2003). El tubérculo de la mayoría de los cultivares importantes son de forma cilíndrica, con algunos pelos como raíz. Existen variedades cuya cáscara es difícil de eliminar y hay otras en las cuales la piel es tan suave que facilita su consumo. Lebot *et al.* (2006) observaron las características físicas de variedades de *D. alata* determinando la influencia de la forma del tubérculo, el color de la pulpa y de la cáscara y la oxidación, en la calidad comestible del tubérculo y su aceptación por el consumidor. Guízar *et al.* (2008) determinaron en tubérculos de especies de *D. remotiflora* y *D. sparsiflora*, morfología, tamaño, peso y porción comestible, en donde ésta última fue del 100 %, mayor a la raíz del chayote (86 %), que es conocido en la zona occidente del país como chinchayote.

2.2 Las saponinas y sapogeninas

Las saponinas son glicósidos muy extendidos en el reino vegetal y también en algunos animales como el pepino de mar. En las plantas, las podemos encontrar en diferentes partes como en raíces, tubérculos, corteza, hojas, semillas y frutas (Wina *et al.*, 2005). Se caracterizan por su capacidad para producir espuma cuando se agita una solución acuosa que las contiene, ya que tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial del agua. Son sustancias sólidas, blancas, amargas con gran poder hemolítico (a concentraciones muy grandes, rompen los glóbulos rojos, poniendo en libertad la hemoglobina), suelen tener actividad antibiótica y ser tóxicas para peces e insectos; aunque no es muy confiable, esta propiedad ha sido utilizada para determinar la concentración de saponinas en soluciones acuosas (Oakenfull, 1981). Sobre el jabón, tienen la ventaja de que no se cortan con aguas duras y de poder emplearse para lavar objetos delicados porque su solución es neutra. A menudo la muerte de animales como vacas, borregos, caballos y en general, animales que se alimentan de pastos u otros forrajes como la alfalfa, se ha atribuido a la presencia de saponinas. Por hidrólisis de las saponinas se obtienen las sapogeninas esteroidales, de gran interés para la industria farmacéutica por ser precursores en la síntesis de hormonas y corticoides. En los últimos años, el desarrollo de técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear y de espectrometría de masas ha sido de gran ayuda en la caracterización y ha permitido un incremento en el número de publicaciones referidas a estos metabolitos (Camel, 2001; Kaufmann *et al.*, 2007; Lin y Yang, 2008; Lee *et al.*, 2009).

2.2.1 Estructura química, clasificación y distribución

Las saponinas son glucósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos, como glucosa, galactosa, ácido glucurónico, xilosa, ramnosa o arabinosa, se enlazan mediante un enlace glucosídico a un resto denominado aglicón (sapogenina) el cual puede ser de naturaleza triterpénica o esteroideal

(Figura 1) y algunas veces esteroidal alcaloide. Los enlaces glucosídicos pueden tener configuración α o β . Según el número de uniones glucídicas al aglicón, las saponinas se denominan: saponinas monodesmosídicas, cuando el azúcar o azúcares (cadena de oligosacáridos) se unen al aglicón en la posición C-3, o saponinas bidesmosídicas, cuando los azúcares se unen por dos puntos al aglicón (C-3 y C-26 o C-28).

Las saponinas triterpénicas tienen el aglicón con 30 átomos de carbono (triterpeno) el cual se biosintetiza por la ruta del ácido mevalónico, todas derivan del dammarano y se subdividen a su vez en: saponinas triterpénicas pentacíclicas, que son las más frecuentes y pueden ser derivados del oleano o derivados del ursano (Figura 1A) y saponinas triterpénicas tetracíclicas que conservan la estructura básica del dammarano.

Las saponinas esteroidales también se biosintetizan por la ruta del ácido mevalónico y son generalmente menos frecuentes que las saponinas triterpénicas pentacíclicas. El aglicón de estas saponinas (sapogenina) presenta el esqueleto tetracíclico característico de este tipo de compuestos, denominado gonano (ciclopentanoperhidrofenantreno) en el caso de ser saturado. La característica estructural fundamental de estas sapogeninas está en la presencia de dos anillos adicionales que se originan a partir del carbón 17 del esqueleto base y están contenidos respectivamente en dos planos perpendiculares entre sí. Además, el átomo de carbono común a estos dos nuevos anillos está unido a dos átomos de oxígeno (estructura de un cetal) por lo que a esta cadena lateral se le ha dado el nombre de cadena espirocetálica. Por lo tanto, las saponinas esteroidales pueden clasificarse de acuerdo a la estructura de los anillos E y F de la sapogenina, en derivados de espirostano (Figura 1B) y en derivados de furostanol, que poseen un ciclo menos que el espirostano pero también tiene un esqueleto de 27 átomos de carbono (Figura 1C). Es frecuente encontrar que en la estructura de las sapogeninas esteroidales, en vez de oxígeno en el anillo F o de OH en la cadena unida en la posición 22, tienen nitrógeno (amina), por lo cual se consideran saponinas y alcaloides a la vez, en donde, a pesar de su aplicación industrial y

farmacéutica, en determinadas concentraciones, son tóxicas para microorganismos, insectos, animales y humanos y por ello cuando están presentes en alimentos se consideran como factores antinutricionales (Díaz, 2009).

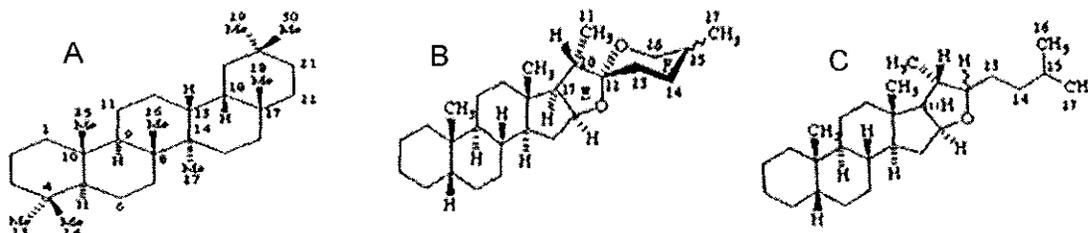


Figura 1. A) Saponina triterpenoide y saponinas esteroides; B) derivado de estirostano; C) derivado de furostano.

Como se había mencionado, las saponinas se sintetizan por la vía del ácido mevalónico, misma vía por la que se forma el colesterol, cuya amplia distribución en el reino vegetal no había sido conocida sino hasta hace poco. En la actualidad, el colesterol es considerado como precursor de un gran número de saponinas esteroidales (Tschesche, 1972; Vincken *et al.*, 2007) como la dioscina cuya sapogenina es la diosgenina (Figura 2). En *Dioscorea*, Bennett *et al.* (1963); Tschesche (1972), Rojas *et al.* (1999) y Vendl *et al.* (2006) mencionan que en la parte aérea de la planta, particularmente en la hoja, es el principal sitio de biosíntesis de saponinas esteroidales y que posteriormente son traslocadas al tubérculo donde son almacenadas; en la célula, estos compuestos se encuentran generalmente almacenados en vacuolas u organelos y son liberados al citoplasma o extracelularmente (Díaz, 2009). En un estudio realizado en *Trigonella foenum-graecum* L., Gómez *et al.* (2004) observaron que los niveles máximos de sapogeninas esteroidales son alcanzados en hojas jóvenes y los más bajos en tallo y raíz.

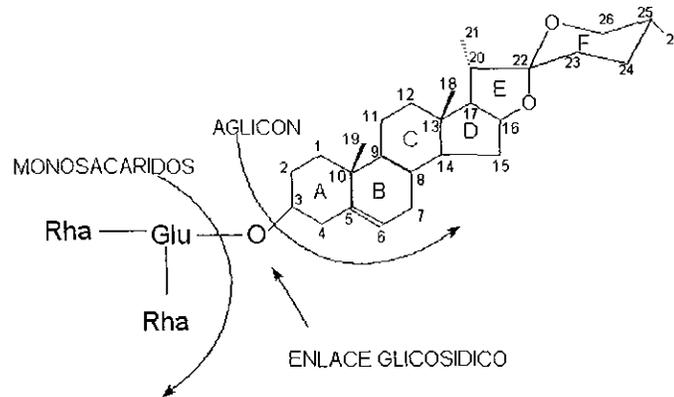


Figura 2. Estructura de la dioscina, una saponina esteroidal.

Las saponinas triterpenoides son encontradas principalmente en dicotiledóneas mientras que las saponinas esteroidales en monocotiledóneas, sin embargo, hay plantas que pueden contener ambas, como la soya que tiene soyasapogenol A (saponina triterpenoide) y estigmasterol (saponina esteroidal) o la avenacoside y avenacina, esteroidal y triterpenoide respectivamente, en plantas de avena (Wina *et al.*, 2005). Los géneros más importantes por su contenido en saponinas esteroidales son, en la familia de las Liliáceas, *Yucca*, *Trillium* y *Smilax*; en las agaváceas el género *Agave* y en las dioscoreáceas, el género *Dioscorea*. En las dicotiledóneas son importantes *Digitalis* (Scrophulariaceae), *Solanum* y *Lycopersicum* (Solanaceae) y *Trigonella* (Papilionaceae). Las fuentes más ricas para la explotación comercial producen diosgenina y su isómero llamado yamogenina, ambas convertibles rápidamente en progesterona.

En 1936, Tsukamoto *et al.* (citado por Marker *et al.*, 1940) aislaron la diosgenina y dilucidaron su estructura como (3 β , 25R)-Spirost-5-en-3-ol, a partir de extractos de un yam oriental, *Dioscorea tokoro* Makino. La diosgenina deriva de la dioscina, una esteroide saponina y contiene, como en el caso del colesterol, una doble ligadura en la posición 5 (Figura 3); esta característica llevó a Russel Marker y colaboradores a transformar a la diosgenina, mediante una serie de reacciones, en la 16-dehidropregnenolona (16-D), sustancia clave para la síntesis

de hormonas relacionadas con la progesterona. Esta serie de reacciones fue conocida como "degradación de Marker", que hoy en día ha sufrido una serie de modificaciones que han mejorado significativamente las condiciones de la reacción (Sharapin, 2000). Todo esto llevó a que, desde principios de la década de 1940, se buscaran fuentes más ricas en diosgenina, en donde, *Dioscorea composita* Hemsl. y *Dioscorea floribunda* Mart. y Gal. fueron la principal fuente explotada en México y América Central (Martin, 1969; Dawson, 1991). Actualmente, saponinas como la hecogenina, del *Agave sisalana* y la solasadina, de plantas del género *Solanum*, pueden ser degradadas de la misma manera.

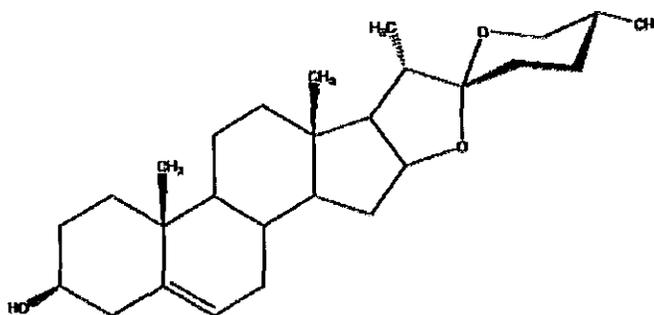


Figura 3. Estructura química de la diosgenina.

2.2.2 Métodos de extracción

Las saponinas tienen elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro ofrece ciertas dificultades, por lo que, al ser heterósidos, se pueden hidrolizar con ácidos dando una genina (sapogenina) y diversos azúcares y ácidos urónicos relacionados. *In vivo*, las saponinas son hidrolizadas por las bacterias intestinales, liberando así el constituyente activo (Pengelly y Bennett, 2011). La dioscina, es un glucósido soluble en solventes polares que al hidrolizarse se obtiene la aglicona (diosgenina) que es completamente insoluble en soluciones acuosas (Mishra y Gaikar, 2004). La obtención de la diosgenina depende principalmente de la

hidrólisis de los azúcares en la posición C-3 (Zhu *et al.*, 2010). Existe una gran cantidad de trabajos en los que se reportan la extracción de saponinas y sapogeninas (Rojas *et al.*, 1999; Niño *et al.*, 2007; Lin y Yang, 2008). Las técnicas más comunes para extracción de diosgenina en especies de *Dioscorea* incluyen la hidrólisis ácida, la fermentación espontánea y la catálisis enzimática (Zhang *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2007). Niño *et al.* (2007) obtuvieron diosgenina en *Dioscorea polygonoides* usando la hidrólisis enzimática, sin embargo, Yang *et al.* (2003) y Narula *et al.* (2005) aplicaron la hidrólisis ácida con soluciones a base de ácido clorhídrico (HCl) o ácido sulfúrico (H₂SO₄). En los mismos trabajos se aprecia la existencia de un tronco común en las metodologías utilizadas que se puede resumir en los siguientes pasos:

a) *Desgrasado del material vegetal*: El mismo tiene como objetivo eliminar los compuestos lipídicos que posee la planta, que pueden afectar operaciones posteriores. El desengrasado puede realizarse directamente al material vegetal o a extractos obtenidos de éste.

b) *Obtención de saponinas*: Se realiza la extracción del material vegetal empleando solventes polares tales como metanol, etanol y n-butanol o mezclas hidroalcohólicas de cada uno de ellos. El n-butanol es muy utilizado por su especificidad para este tipo de compuestos.

c) *Hidrólisis de las saponinas*: Generalmente se realiza por vía química, utilizando un ácido mineral como catalizador y su finalidad es liberar las sapogeninas. En la industria, es común el uso de ácido sulfúrico (Zhu *et al.*, 2010).

Existen algunas enzimas del tipo de las glucosidasas que se han utilizado para llevar a cabo dicha hidrólisis con resultados más satisfactorios (Niño *et al.*, 2007).

Ganzler *et al.* (1986, 1990), Kaufmann *et al.* (2007) entre otros, proponen como una rápida y adecuada técnica, la extracción asistida con microondas; la extracción con fluidos supercríticos, es otro novedoso método para la obtención de compuestos en matrices sólidas (Camel, 2001; Brachet *et al.*, 2000).

d) *Extracción de las sapogeninas liberadas en el proceso de hidrólisis*: En este proceso se utilizan solventes de mediana polaridad como acetato de etilo, cloroformo, ciclohexano o tolueno.

2.2.3 Métodos de identificación y cuantificación

En el aislamiento y purificación de estos compuestos, los métodos cromatográficos juegan un papel decisivo. Si se cuenta con patrones adecuados la cromatografía de capa fina (CCF) es un procedimiento eficaz para detectar de forma rápida las sapogeninas presentes en un extracto (Lorey *et al.*, 1996), lo cual puede ser corroborado por otros procedimientos. También se reporta el uso de la cromatografía de capa delgada preparativa (CCDP) (Heftman, 1976; Luck de Ugaz, 1988) y cromatografía de columna (CC) (Usubillaga y Meccia, 1987). Entre los adsorbentes más utilizados en estas técnicas se encuentran la alúmina, la silicagel de diferentes granulometrías y sephadex LH-20 (Hostettmann *et al.*, 1986). Una aplicación práctica de estas técnicas, se encuentra en los trabajos realizados por Qi *et al.* (2009) y Zhu *et al.* (2010) en donde, previo a su cuantificación, pudieron identificar la presencia de diosgenina mediante CCF en *Dioscorea zingiberensis*. Adicionalmente, la cromatografía gaseosa (CG) (Rojas *et al.*, 1999; Kaufmann *et al.*, 2007) y más recientemente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Gómez, *et al.*, 2004; Lin y Yang, 2008) son técnicas que se pueden combinar con las anteriores para determinar la presencia de saponinas y sapogeninas. Ejemplo de esto último, es el trabajo de Lin y Yang (2008), en el que determinan la presencia de saponinas esteroidales de tubérculos de *Dioscorea* mediante la utilización combinada de CC y HPLC.

Entre otros métodos de identificación de sapogeninas se encuentran las técnicas espectroscópicas, por ejemplo, el espectro infrarrojo (IR) nos puede revelar la presencia de determinados grupos funcionales (OH, CO, etc.) que poseen una frecuencia de absorción característica.

La espectrometría de masas (EM) es una técnica que ha tenido amplia aplicación en el campo de los productos naturales. En el caso de las sapogeninas

esteroidales los trabajos de Budzikiewicz *et al.* (1964) marcaron pautas para la interpretación de los espectros y el establecimiento de los patrones de fragmentación de dichas sustancias. El espectro de masas de una sapogenina esteroidal permite establecer el sistema de anillos, la naturaleza y posible localización de un sustituyente. Lee *et al.* (2009) identificaron y cuantificaron saponinas esteroidales en *Panicum virgatum* L. usando un método conformado por HPLC-ESI-ES. Lin y Yang (2008), determinaron la cantidad de diosgenina en diferentes órganos de la planta de *Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto, usando la técnica de HPLC mostraron que el tubérculo fue el que presentó mayor contenido. La cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (CG-EM) ha resultado una técnica eficiente para la cuantificación de diversas sapogeninas esteroidales en *Trigonella foenum-graecum* L. y en *Dioscorea zingiberensis* (Taylor *et al.*, 1997; Kaufmann *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009).

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica muy poderosa y útil en la caracterización de saponinas y sapogeninas esteroidales (Lee *et al.*, 2009), mostrando por medio de señales, los sustituyentes o insaturaciones en las distintas posiciones de las saponinas o sapogeninas. En los glicósidos, además de caracterizar el aglicón es necesario determinar el número de monosacáridos y caracterizarlos, lo que se realiza a partir del número de señales correspondientes a carbonos anoméricos y por comparación con espectros de azúcares libres.

Las saponinas y sus geninas tienen un gran valor por sus diversas funciones biológicas así como por los usos que se les han dado en la industria. Su aislamiento sigue prácticamente un mismo procedimiento, variando en la parte de la hidrólisis de las saponinas y cuya adecuada elección depende de los intereses del investigador; así también, las técnicas de cuantificación, que son muy diversas y algunas más especializadas que otras, pueden manejarse con una adecuada combinación de dos o más de ellas, de acuerdo al equipo que se tenga disponible.

2.2.4 Importancia y aplicaciones

El papel de las saponinas en las plantas aún no está muy claro, pero se cree que es importante en la defensa química de las mismas. Esto significa que son consideradas como metabolitos secundarios, porque aunque son importantes para la interacción de la planta con su entorno, no son indispensables para la vida de la misma, también, las saponinas son consideradas defensas constitutivas, es decir, que se producen durante todo el ciclo de la célula pero su concentración puede aumentar como respuesta a un estímulo (Díaz, 2009). Hay estudios en los que se les ha encontrado actividad antifúngica, antimicrobiana así como contra algunos herbívoros (Rochfort y Panozzo, 2007).

Los elementos fitoquímicos encontrados en las plantas, han ido ganando importancia sobre las drogas sintéticas en la prevención o tratamiento de enfermedades crónicas. Es por eso que las saponinas y sus sapogeninas, han sido utilizadas en la medicina alternativa o como complemento en la medicina tradicional contra una variedad de enfermedades incluyendo diversos tipos de cáncer. Estudios etnobotánicos refieren que los aztecas y los mayas utilizaban especies silvestres de *Dioscorea* como analgésico contra el dolor y en el año 1500 A.C., los egipcios empleaban las semillas de fenogreco, fuente importante de sapogeninas esteroidales (Gómez *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2007), como medicina para inducir el parto (Raju y Rao, 2012).

Las hormonas esteroidales, sexuales y corticoides, así como los anticonceptivos, son productos de transformación, de síntesis parcial, cuya materia prima es de origen vegetal. La primera materia prima utilizada fue la diosgenina (Figura 4), aislada de los tubérculos del género *Dioscorea*, principalmente *D. composita* Hemsl. y *D. floribunda* Mart. y Gal; el principal productor de esta materia prima fue México, seguido en escala menor por China, India, Puerto Rico y Guatemala. Posteriormente fue utilizada la hecogenina (*Agave sisalana*), la solasodina aislada de varias especies del género *Solanum* y el estigmasterol, aislado de la fracción insaponificable del residuo de la refinación del aceite de soya (*Glycine max*) (Sharapin, 2000).

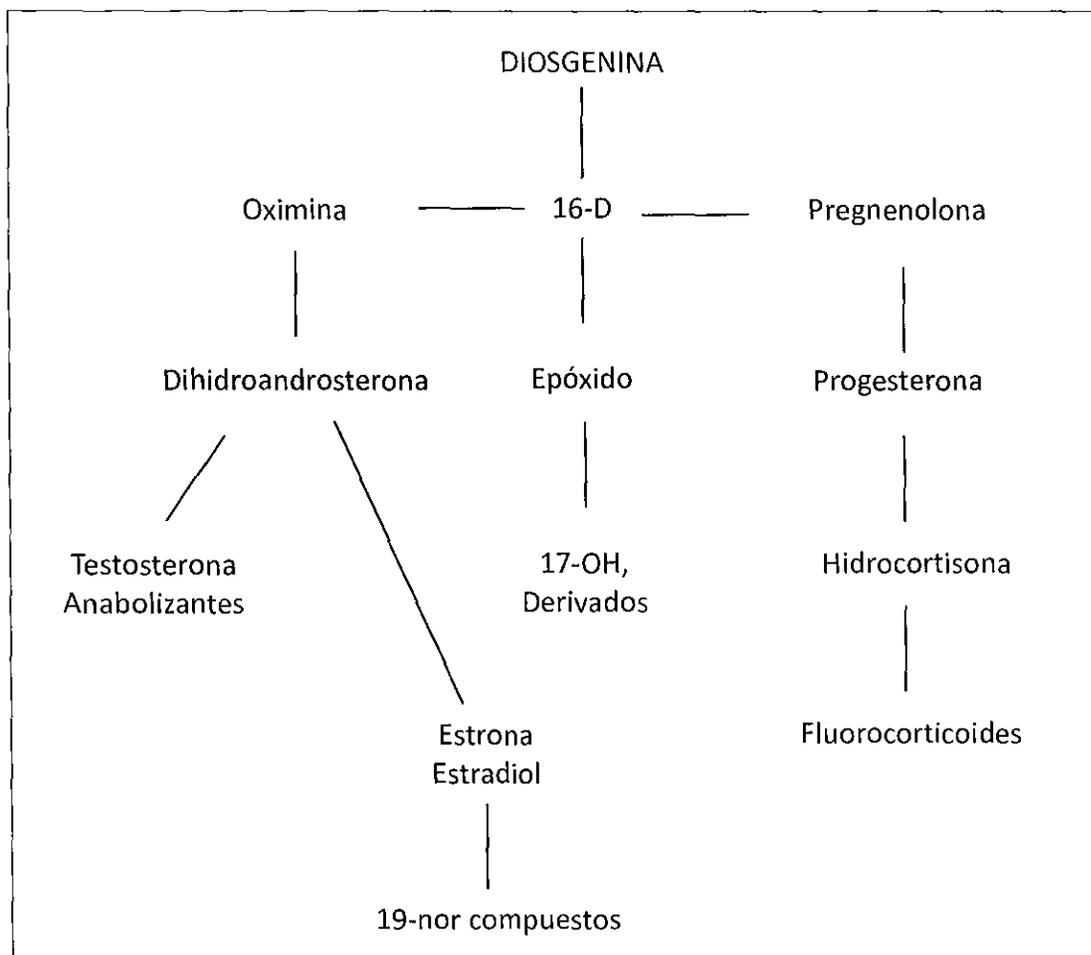


Figura 4. Transformación de la diosgenina en hormonas.

En 1958, Shrum y colaboradores llevaron a cabo un minucioso estudio de plantas que contenían sapogeninas, particularmente de plantas de los géneros *Yucca*, *Agave*, *Strophanthus* y *Dioscorea* y concluyeron que *Dioscorea* es la fuente más abundante de sapogeninas. Así, se considera que los tubérculos de *Dioscorea* de mayor importancia medicinal son *D. composita*, *D. floribunda* y *D. mexicana* en México; *D. elephantipes* y *D. sylvatica* en Sudáfrica; *D. deltoidea* y *D. prazeri* en la India (Ammirato, 1984).

En las últimas dos décadas, se han llevado a cabo diversos estudios para comprender el papel beneficioso de la diosgenina contra enfermedades metabólicas como la hipercolesterolemia, dislipidemia, diabetes y obesidad (Raju y

Rao, 2012); también se le ha encontrado actividad antiinflamatoria, anticancerígena, antireumática, antienvjecimiento, inmunoregulatorio, cardiocerebrovascular, gastropatía protectora, anti-osteoporosis y antifúngico (Sautour *et al.*, 2007; Raju y Metha, 2009; Cronin y Draelos, 2010). Se ha demostrado que, comparado con la hecogenina y la tigogenina, la diosgenina es más efectiva contra el cáncer. Esta bioactividad anticancerígena de la diosgenina está relacionada con su conformación estructural, en particular por el doble enlace en el átomo C-5 (Corbiere *et al.*, 2003; Trouillas *et al.*, 2005). Adicionalmente, ha tenido buen papel en el tratamiento del VIH y la hepatitis-C, así como en enfermedades del hígado (Raju y Rao, 2012).

2.3 Diversidad genética y la importancia de la caracterización

La relación entre las plantas y los humanos nace mucho antes de que surgiera la agricultura como actividad importante para la supervivencia. Las plantas fueron, primero, fuente de alimento gracias a la colecta que se hacía de ellos con ese propósito, lo mismo que sirvieron de materia prima para la fabricación de implementos diversos, vestido, pigmentos y medicina. Una vez que surge la actividad agrícola, la ya estrecha relación entre plantas y humanos se vuelve una dependencia simbiótica entre algunas especies vegetales y las comunidades humanas.

Por ello, debido a factores económicos, ambientales, y de nutrición y salud, combinados con el incremento sostenido del número de pobladores humanos, se hace necesario y obligado el estudio científico de aquellas especies vegetales que, mediante el manejo apropiado, permitan tanto la adecuada administración ambiental, como el aprovechamiento y la producción sostenible de alimentos y materias primas para uso farmacéutico, industrial, textil y culinario, entre otros.

Como todo organismo vivo que se desarrolla en condiciones naturales, los individuos que conforman una especie vegetal, están sometidos a diversos factores bióticos (microorganismos, otras especies vegetales, animales inferiores y superiores) o abióticos (clima y suelo), adaptando su información genética de

acuerdo a su entorno. De esta manera, aunque la población de individuos de una misma especie comparte características comunes y se pueden cruzar entre sí mismos, también es cierto que en cada uno existen muchas variantes individuales. La suma de todos los individuos con sus respectivas variantes es lo que se conoce como variabilidad genética de una especie. Por lo tanto, desde el punto de vista de su expresión, la variabilidad contenida en el genoma de una especie puede clasificarse en dos: 1) la que se expresa en características visibles y que conforman el fenotipo y 2) la que no se expresa en características visibles y que en general se refiere a los procesos o productos internos de la planta. En la caracterización de una especie se estima la variabilidad genética existente de la población de individuos que lo conforman (Franco e Hidalgo, 2003).

Por lo tanto, resulta la necesidad de caracterizar especies de plantas aún silvestres con potencial económico, para que se unan a la importante lista de las especies ya domesticadas, de tal manera que, bajo sistemas de producción intensiva, provean de nuevas alternativas de aprovechamiento para la población humana (Benavides *et al.*, 2010).

2.4 El cultivo de tejidos vegetales en *Dioscorea*

Los tubérculos de *Dioscorea* son una fuente importante de alimento para muchas regiones del mundo y en donde también es aprovechado en el campo de la medicina y farmacología por su considerable contenido de diosgenina. Aunque la producción de camotes de *Dioscorea* es solo 1/10 de la de yuca y batata, la mayoría son cultivados y consumidos localmente; por lo tanto, cualquier mejoramiento en esta especie es importante para incentivar la agricultura sostenible en estas regiones (Royero, *et al.*, 2007). La propagación de este cultivo por semilla sexual presenta dificultades ya que son plantas dioicas y con flores pequeñas (Acosta, 1987). Debido a su alta heterocigocidad, los cultivos y clones élite son propagados vegetativamente (Kadota y Niimi, 2004). Para esto, se emplea segmentos de tallos, bulbillos axilares llamados "gundas" y tubérculos enteros o segmentos de los mismos. Las tasas de multiplicación vegetativa son muy bajas y este sistema constituye un medio de transmisión de plagas y enfermedades. El desarrollo de nuevas técnicas de propagación son necesarias para proveer plantas de calidad.

El establecimiento de una metodología eficaz para la propagación *in vitro* de especies de *Dioscorea* tiene gran importancia en diferentes áreas de la agricultura, ya que permite la producción de plantas libres de patógenos, rápida multiplicación, producción de semilla de alta calidad y conservación de germoplasma (Cabrera *et al.*, 2003; Balogun, 2009), así como la obtención de metabolitos secundarios de alta calidad. Aplicando el cultivo de tejidos vegetales para la conservación de germoplasma, Borges *et al.* (2004) estudiaron el potencial de regeneración de plantas de *D. alata* preservadas *in vitro*; los resultados mostraron 100 % de regeneración de los explantes a partir de material *in vitro* mantenido en medio D-571 suplementado con 1.5 % manitol + 0.1mgL⁻¹ BA + 2 gL⁻¹ de carbón activado.

Se calcula que más de 100,000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla *et al.*, 2005) y un gran número de ellos tienen actividad biológica, de ahí la necesidad de utilizar tecnologías diversas para su producción, caracterización e identificación. Mundialmente existe un 44 % de nuevos

medicamentos basados en productos naturales y en países desarrollados el 25 % de los medicamentos son derivados de plantas. La demanda de estos productos naturales ha incrementado en los últimos años debido a que existen limitaciones en los procesos de obtención de fórmulas basadas en la síntesis química, además, el costo de los biofármacos limita su disponibilidad en el mercado y no satisface las necesidades de la población mundial. Otro aspecto importante, ha sido que muchas especies vegetales están en peligro de extinción o se han extinguido debido a las condiciones ambientales provocadas por el hombre y a la sobreexplotación (Makunga y van Staden, 2008).

El cultivo de tejidos presenta aspectos y aplicaciones prácticas muy variadas en la que destaca la producción de metabolitos secundarios de plantas. Las principales ventajas del cultivo *in vitro* en comparación con el cultivo convencional de plantas, es que se pueden obtener las sustancias de interés al controlar las condiciones ambientales y del medio, ya que estos sistemas son independientes de factores externos como disponibilidad de tierra, clima y condiciones geopolíticas. Además, es posible controlar las condiciones del cultivo alcanzando mayor rendimiento y calidad (Arias *et al.*, 2009) y el proceso de extracción puede ser más simple, rápido y eficiente (Pérez y Jiménez, 2011). Hasta el momento, la mayoría de las investigaciones relacionadas con la producción de metabolitos secundarios de plantas mediante cultivo *in vitro* han estado centradas en la utilización de tejidos indiferenciados como callos y suspensiones celulares.

Con técnicas como el cultivo de células en suspensión, es posible obtener metabolitos secundarios como la diosgenina, incluso a concentraciones más elevadas que en la planta entera. Rokem *et al.* (1985), describieron la aplicación de diferentes métodos para mejorar la producción de diosgenina en suspensiones celulares de *D. deltoidea*. Otros estudios, como los realizados por Rojas *et al.* (1999), Gómez *et al.* (2004), Narula *et al.* (2005), entre muchos otros, han buscado alternativas a partir del cultivo de tejidos vegetales para hacer eficiente la producción de diosgenina. Para lograr el éxito en la aplicación de estos sistemas

de propagación clonal, es importante tener en cuenta el genotipo, su estado fisiológico, la selección del explante (parte de la planta), el suministro de nutrientes al medio de cultivo, el empleo de reguladores de crecimiento y las condiciones ambientales para el desarrollo de las plántulas y/o metabolitos de interés (Perea y Buitrago, 2000). Es por tanto el cultivo de tejidos vegetales, una herramienta para el aprovechamiento racional de nuestra biodiversidad.

III HIPÓTESIS

Existen diferencias en el contenido de diosgenina y en composición química en plantas de camote de cerro de diferentes localidades del Estado de Jalisco.

Las características físicas de las accesiones de camote de cerro de las diferentes localidades del Estado de Jalisco no presentan diferencias.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivos Generales:

Cuantificar el contenido de diosgenina y determinar la composición química de poblaciones locales de camote del cerro (*Dioscorea* spp) colectadas en el Estado de Jalisco, México.

4.2 Objetivos Específicos:

1. Establecer un protocolo para la extracción y cuantificación de diosgenina en tubérculos de camote del cerro.
2. Cuantificar el contenido de diosgenina mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de accesiones de camote del cerro provenientes de diferentes localidades del Estado de Jalisco.
3. Determinar las características físicas y la composición química de tubérculos de camote del cerro.
4. Establecer un protocolo para la producción de callos *in vitro* de accesiones de *Dioscorea* del Estado de Jalisco.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de trabajo

Este trabajo se desarrolló en el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), de la Universidad de Guadalajara (UDG), ubicado en Nextipac, Jalisco. El CUCBA está situado a 20° 45' N y 103° 31' O, con una altitud de 1650 m. Los análisis cromatográficos y de composición química de las accesiones de camote del cerro se desarrollaron en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) ubicado en Guadalajara, Jalisco.

5.2 Material vegetal

Se colectaron tubérculos de *Dioscorea* de once localidades del Estado de Jalisco: Acatic, Chapala, Ixtlahuacán de los Membrillos, Ixtlahuacán del Rio, Manzanilla de la Paz, San Antonio (Chapala), San Gabriel, Zapotlanejo, Autlán, San Martín Hidalgo y Cocula (Cuadro 2). El material vegetal se conservó en bolsas de papel, a la sombra y a temperatura ambiente hasta su brotación. Después de su establecimiento, dichas accesiones fueron identificadas taxonómicamente por investigadores del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara (IBUG) a partir de muestras de tallo, hoja y flor, en la Figura 5 se muestran las dos especies identificadas. De esa colección, se seleccionaron tubérculos de 60 accesiones de las localidades mencionadas (Cuadro 3), cuyas especies correspondieron a *D. remotiflora* y *D. sparsiflora*, en donde ésta última es la más predominante entre las accesiones seleccionadas.

Cuadro 2. Muestreo de las accesiones de *Dioscorea* colectadas en el Estado de Jalisco.

Localidad	Coordenadas	Accesiones por localidad
Chapala	20°18'24''N, 103° 11'39.91''O	5
San Antonio (Chapala)	20°19'18''N, 103° 13'17.90''O	5
Cocula	20°28'19''N, 103° 46' 8.84''O	4
Ixtlahuacán de los Membrillos	20°21'14.5''N, 103° 14'27.4''O	5
Manzanilla de la Paz	20°3'16.1''N, 103° 3'2.4''O	9
Acatic	20°52'16.1''N, 102° 54'24.1''O	5
Ixtlahuacán del Río	20°59'1''N, 103° 11'1.94''O	5
San Gabriel	19°43'57.04''N, 103° 43'52''O	6
Zapotlanejo	19°57'6.2''N, 105° 14'23.7''O	5
San Martín Hidalgo	20°22'16.7''N, 103° 58'49.3''O	5
Autlán	20°22'16.7''N, 103° 58'49.3''O	6
TOTAL		60

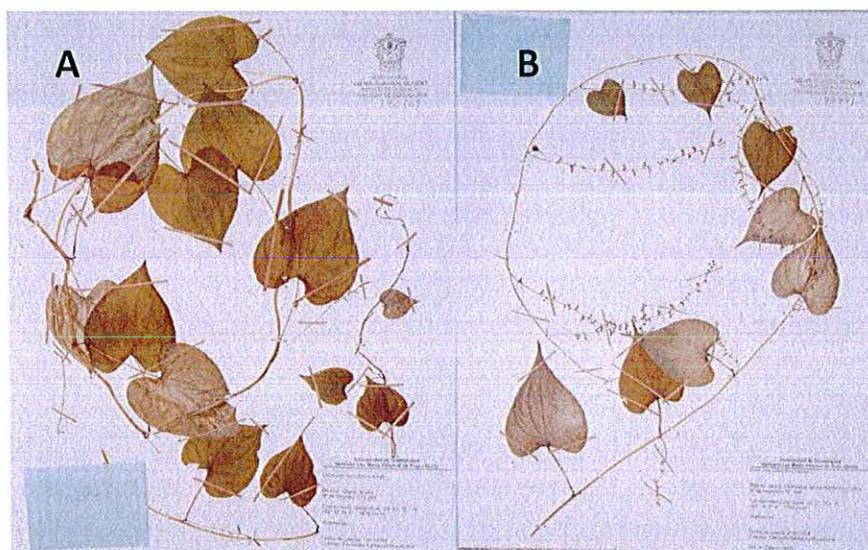


Figura 5. Especies de *Dioscorea* identificadas, colectadas de 11 localidades del Estado de Jalisco: A) *D. sparsiflora*; B) *D. remotiflora*.

Cuadro 3. Sesenta accesiones de *Dioscorea* provenientes del Estado de Jalisco utilizadas para el presente estudio.

No. de Accesión	Localidad	Especie	No. de Accesión	Localidad	Especie
1	Chapala	<i>D. sparsiflora</i>	253	Ixtlahuacán del Río	<i>D. sparsiflora</i>
3	Chapala	<i>D. sparsiflora</i>	259	Ixtlahuacán del Río	<i>D. sparsiflora</i>
4	Chapala	<i>D. sparsiflora</i>	261	Ixtlahuacán del Río	<i>D. sparsiflora</i>
5	Chapala	<i>D. sparsiflora</i>	264	Ixtlahuacán del Río	<i>D. sparsiflora</i>
10	Chapala	<i>D. remotiflora</i>	267	Ixtlahuacán del Río	<i>D. sparsiflora</i>
33	San Antonio (Chapala)	<i>D. sparsiflora</i>	303	San Gabriel	<i>D. sparsiflora</i>
35	San Antonio (Chapala)	<i>D. sparsiflora</i>	305	San Gabriel	<i>D. sparsiflora</i>
38	San Antonio (Chapala)	<i>D. sparsiflora</i>	307	San Gabriel	<i>D. sparsiflora</i>
42	San Antonio (Chapala)	<i>D. sparsiflora</i>	310	San Gabriel	<i>D. sparsiflora</i>
83	San Antonio (Chapala)	<i>D. sparsiflora</i>	313	San Gabriel	<i>D. sparsiflora</i>
48	Cocula	<i>D. sparsiflora</i>	314	San Gabriel	<i>D. sparsiflora</i>
55	Cocula	<i>D. sparsiflora</i>	350	Zapotlanejo	<i>D. sparsiflora</i>
72	Cocula	<i>D. sparsiflora</i>	354	Zapotlanejo	<i>D. sparsiflora</i>
76	Cocula	<i>D. sparsiflora</i>	357	Zapotlanejo	<i>D. sparsiflora</i>
88	Ixtlahuacán de los Membrillos	<i>D. sparsiflora</i>	359	Zapotlanejo	<i>D. sparsiflora</i>
89	Ixtlahuacán de los Membrillos	<i>D. sparsiflora</i>	362	Zapotlanejo	<i>D. sparsiflora</i>
91	Ixtlahuacán de los Membrillos	<i>D. sparsiflora</i>	420	Autlán	<i>D. sparsiflora</i>
167	Ixtlahuacán de los Membrillos	<i>D. sparsiflora</i>	421	Autlán	<i>D. sparsiflora</i>
169	Ixtlahuacán de los Membrillos	<i>D. sparsiflora</i>	422	Autlán	<i>D. sparsiflora</i>
201	Manzanilla de la Paz	<i>D. sparsiflora</i>	430	Autlán	<i>D. sparsiflora</i>
205	Manzanilla de la Paz	<i>D. sparsiflora</i>	434	Autlán	<i>D. sparsiflora</i>
206	Manzanilla de la Paz	<i>D. sparsiflora</i>	435	Autlán	<i>D. sparsiflora</i>
207	Manzanilla de la Paz	<i>D. remotiflora</i>	471	San Martín Hidalgo	<i>D. sparsiflora</i>
208	Manzanilla de la Paz	<i>D. sparsiflora</i>	472	San Martín Hidalgo	<i>D. sparsiflora</i>
221	Acatic	<i>D. remotiflora</i>	473	San Martín Hidalgo	<i>D. sparsiflora</i>
224	Acatic	<i>D. sparsiflora</i>	475	San Martín Hidalgo	<i>D. sparsiflora</i>
225	Acatic	<i>D. remotiflora</i>	478	San Martín Hidalgo	<i>D. sparsiflora</i>
239	Acatic	<i>D. remotiflora</i>	600	Manzanilla de la Paz	<i>D. sparsiflora</i>
243	Acatic	<i>D. remotiflora</i>	600-1	Manzanilla de la Paz	<i>D. sparsiflora</i>
			600-2	Manzanilla de la Paz	<i>D. sparsiflora</i>
			600-8	Manzanilla de la Paz	<i>D. sparsiflora</i>

5.2.1 Establecimiento del camote de cerro en vivero

Para el desarrollo de este proyecto, en junio de 2010, las plantas de camote de cerro fueron crecidas a partir de 200 g de segmentos de tubérculo en etapa de brotación (Figura 6A) en un sustrato formado de 30 % de jal y 70 % de tierra de hoja (agregando a la mezcla 2 kg de vermicomposta) sobre cajas de plástico negras de 60 x 40 x 25 cm de altura (Figura 6B) en un vivero con malla sombra al 50 % ubicado en el CUCBA (Figura 6C). A cada contenedor se le colocó rafia como tutor ya que las plantas son de hábito trepador. Antes y después del temporal de lluvias, las plantas se regaron dos veces por semana. La fertilización se llevó a cabo cada semana agregando nitrógeno, fósforo y potasio a una proporción de 20-10-10 (Scott Peters®) y una dosis de 5 gL⁻¹, aplicando 50 mL de la solución por contenedor; a partir del mes de agosto hasta noviembre, se fertilizó una vez por mes con 5 g de nitrato de calcio granulado por contenedor. Se realizaron podas periódicas manteniendo las plantas a una altura aproximada de 2 m. Los tubérculos se cosecharon manualmente en enero del 2011 (Figura 6D).

5.2.2 Conservación y multiplicación del material vegetal *in vitro*

Para la formación de callos en condiciones *in vitro* se utilizó material vegetal de accesiones de camote de cerro *in vitro* de una colección perteneciente al Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CUCBA.

Se realizaron transferencias mensuales, llevando a cabo la conservación del material vegetal *in vitro* por medio de proliferación de yemas axilares (Figura 7A) de la siguiente manera: se utilizó como explante, segmentos de brotes de cada uno de los materiales; bajo campana de flujo laminar, los explantes se transfirieron a frascos de vidrio con tapa de plástico autoclavable no hermética conteniendo 25 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) estéril con 2 mgL⁻¹ de cinetina (KIN) como regulador de crecimiento para inducir la brotación de yemas axilares. Los cultivos se incubaron a 27 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y una intensidad lumínica de 1500 luxes (Figura 7B).

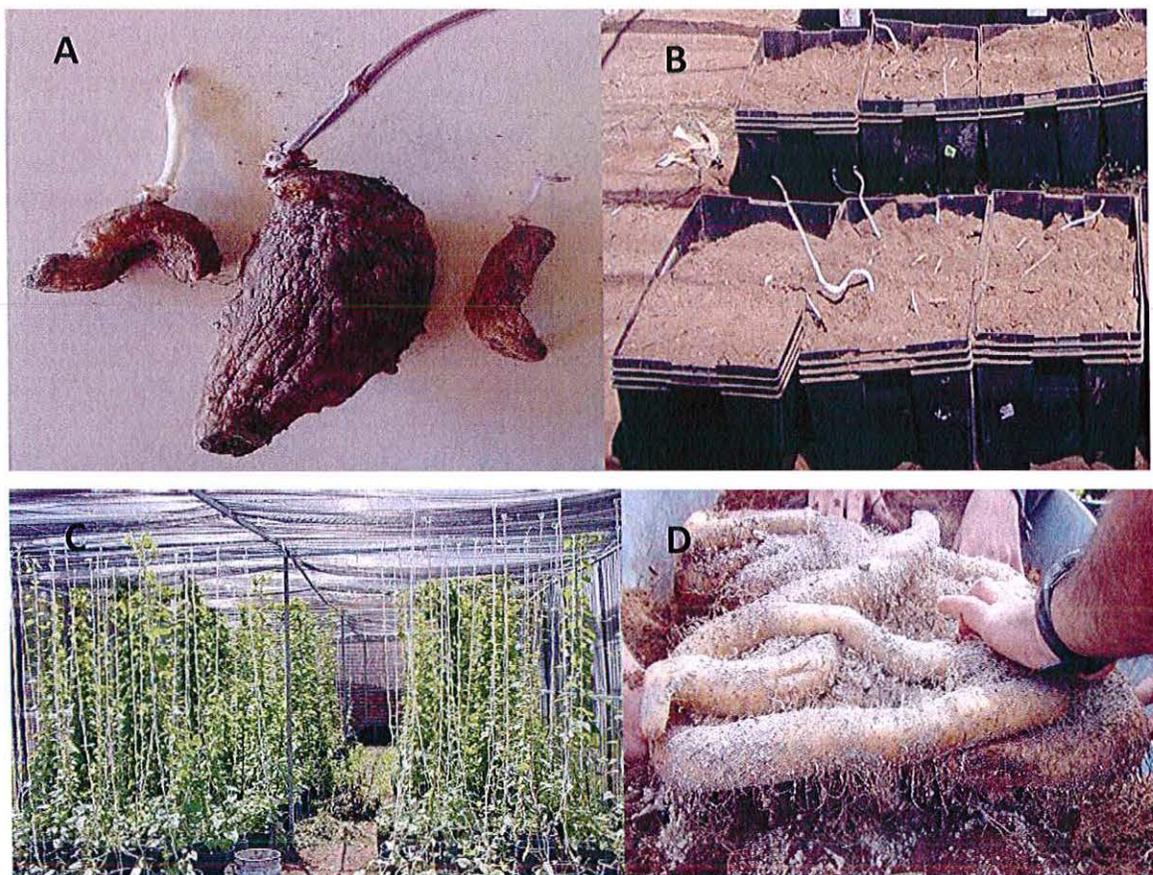


Figura 6. Establecimiento del camote de cerro en vivero: A) tubérculo en etapa de brotación; B) establecimiento de los tubérculos en contenedores; C) vivero con malla sombra; D) cosecha del tubérculo.

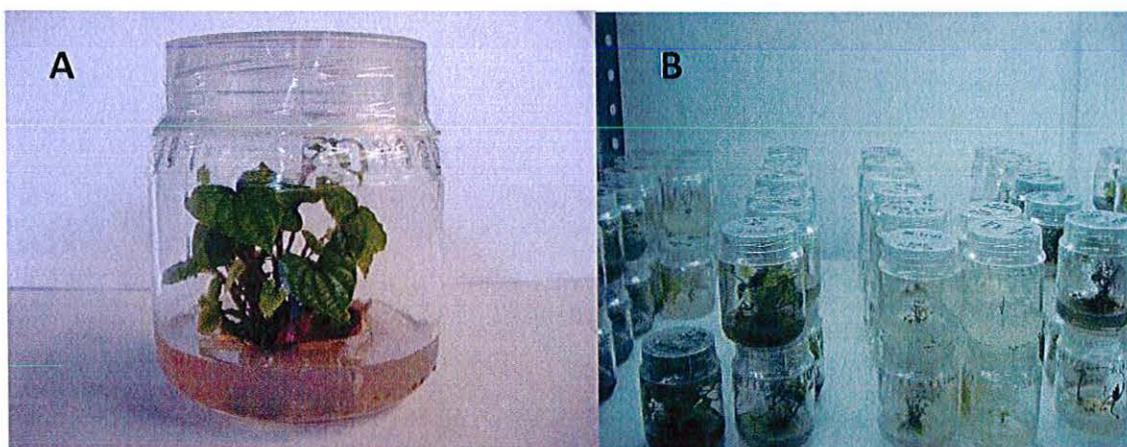


Figura 7. Conservación y multiplicación *in vitro* de camote de cerro: A) proliferación por medio de yemas axilares; B) conservación de accesiones.

5.3 Extracción y cuantificación de diosgenina en accesiones de camote de cerro del Estado de Jalisco

5.3.1 Protocolo para la extracción de diosgenina

El proceso se llevó a cabo con material vegetal originario de la localidad de Ixtlahuacán del Río. Se probaron cuatro métodos de extracción con cuatro soluciones como solventes de extracción para la obtención de saponinas. La combinación de estos factores dio lugar a un experimento factorial el cual se llevó a cabo en un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones (Cuadro 4). Los tubérculos cosechados, se limpiaron y cortaron en hojuelas de 2 mm de espesor con una rebanadora MEXCUT[®] K-250 y se secaron en un horno por convección (SANSON[®], CONVECTION PLUS HCX II) a 60 °C hasta peso constante. Previo a su análisis, el material seco se molió en un molino de cuchillas IKA[®]-WERKE M20 y se pasó por un tamiz malla 40 para homogeneizar el tamaño de partícula. La harina obtenida se desgrasó en un aparato Soxhlet con éter de petróleo (p.e. 30-60 °C) durante 4 h, eliminando el exceso de solvente en un horno a 60 °C por 2 h. La harina desgrasada se sometió a los cuatro métodos de extracción: extracción en Soxhlet (ES), maceración (MC), maceración con ultrasonido (MC-US) y baño en agua (BA) con cuatro tipos de disolventes: metanol al 100 %, (MeOH100), etanol acuoso al 70 % (EtOH70), etanol acuoso al 80 % (EtOH80) y 2-propanol acuoso al 70 % (PropOH70). Cada tratamiento se hizo por triplicado. El método ES se llevó a cabo de acuerdo a lo propuesto por Niño *et al.*, (2007): 10 g de harina se extrajeron con 200 mL de solvente en un aparato Soxhlet durante 6 h. El extracto se concentró hasta sequedad a 40 °C a presión reducida, después se resuspendió en 10 mL de agua y se extrajo tres veces con 6 mL de *n*-butanol saturado con agua y el extracto butanólico se concentró hasta sequedad a 40 °C a presión reducida en un evaporador rotatorio para obtener el crudo de saponinas. Para MC, se modificó el método reportado por Lin y Yang (2008): 50 g de harina se extrajeron con 400 mL de solvente por 48 h a temperatura ambiente. La mezcla se filtró y se lavó con 100 mL de solvente y éste se removió en un rotavapor. El residuo se resuspendió en 25 mL de agua destilada y se extrajo con

25 mL de *n*-butanol por 3 veces. El extracto butanólico se lavó con 50 mL de agua destilada por tres ocasiones y se concentró a sequedad a presión reducida en un rotavapor a 40 °C, para obtener el crudo de saponinas. MC-US, se desarrolló tal como MC pero aplicando 5 min de ultrasonido con una frecuencia de 40 kHz (BRANSON® 2510) antes de filtrar la mezcla. El método BA se llevó a cabo con 100 mg de harina desgrasada usando un método similar a Taylor *et al.* (2000) para *Trigonella foenum-graecum*.

Cuadro 4. Diseño experimental bifactorial: Método de extracción vs solvente.

Solvente	Método de extracción*			
	ES	MC	MC-US	BA
MeOH100	1	2	3	4
EtOH70	5	6	7	8
EtOH80	9	10	11	12
PropOH70	13	14	15	16

*Cada tratamiento se hizo por triplicado. MeOH100, 100 % metanol; EtOH70, 70 % etanol acuoso; EtOH80, 80 % etanol acuoso; PropOH70, 70 % 2-propanol acuoso; ES, extracción en Soxhlet; MC, maceración; MC-US, maceración-ultrasonido; BA, baño en agua.

La hidrólisis del crudo de saponinas se llevó a cabo adicionando 5 mL de agua y 5 mL de ácido sulfúrico 1 M en 70 % de 2-propanol acuoso. La mezcla se calentó en una autoclave a 120 °C y una presión de 1.2 kg/cm² por tres horas. Después de enfriar, se adicionó agua. Para obtener la diosgenina, el hidrolizado se extrajo tres veces con ciclohexano, centrifugando 2 min a 3,000 rpm entre cada extracción. La mezcla de los extractos de ciclohexano se neutralizó lavando con solución de NaOH 1 M y agua, el resto de humedad se eliminó agregando MgSO₄ anhidro, se filtró y se concentró hasta sequedad. Previo al análisis por CG-EM, el residuo se resuspendió con ciclohexano (1 mL).

El método y solvente de extracción de diosgenina, MC+EtOH80, fue modificado por Tostado (2012) y se aplicó a 25 g de la harina desgrasada de cada una de las sesenta accesiones de las once localidades de Jalisco por duplicado. Los extractos obtenidos se resuspendieron a 1 mL con ciclohexano y se analizaron para diosgenina por CG-EM haciendo dos inyecciones para cada muestra.

5.3.2 Análisis por cromatografía de gases-masas (CG-EM)

La cuantificación de diosgenina se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N acoplado con un espectrómetro de masas Agilent 5975 y equipado con un autoinyector Agilent 7863B series (Palo Alto, CA, EUA). El detector selectivo de masas fue operado a 70 eV. Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo constante de 1.2 mL/min. La inyección (1 μ L) se llevó a cabo en modo split (1:1) a 250 °C. La línea de transferencia y la temperatura del detector fueron 230 y 300 °C, respectivamente. La separación se realizó en una columna capilar HP-5MS de 30 m x 0.25 mm d.i x 0.25 μ m recubierta con una película de fenil metil siloxano. La temperatura inicial del horno fue de 200 °C, después se realizó un incremento lineal a una velocidad de 10 °C/min hasta 270 °C, enseguida 1 °C/min hasta 286 °C y finalmente 10 °C/min hasta 300 °C, manteniendo por 5 min. El tiempo de corrida fue de 29.40 min. La identificación de la diosgenina se llevó a cabo en modo SIM utilizando el ion base de m/z 139 además de los iones de m/z 282, 271, 300, 343 y 414. Se obtuvo una curva de calibración usando siete concentraciones de diosgenina en un rango de 0.2 y 50 ppm (~ 95% de pureza SIGMA[®], EUA [CAS: 512-04-9]) resultando un coeficiente de determinación (R^2) de 0.998. Las soluciones se prepararon en etanol grado cromatográfico (MERCK[®], Alemania). La integración de la diosgenina se hizo usando un software Agilent Technologies MSD ChemStation E.02.01. La cuantificación en las muestras se basó en la relación del área del pico usando el ion principal m/z 139 con la ecuación de la curva de calibración. Los cromatogramas obtenidos se analizaron también con el apoyo de la librería del equipo (NIST05L A.01.00). El contenido de diosgenina en las diferentes

accesiones fue el promedio de las dos muestras con sus respectivas inyecciones y se expresó en mg por kg de tubérculo seco.

5.4 Cuantificación de diosgenina en hojas de plantas de *Dioscorea* en accesiones de Jalisco

Aunque no es un objetivo del proyecto, se quiso aprovechar la metodología utilizada para la extracción de diosgenina en tubérculos para aplicarla en hojas de las plantas de *Dioscorea*. Las hojas de las accesiones seleccionadas (Cuadro 5), se colectaron de la parte aérea de las plantas de *Dioscorea* establecidas en el vivero con malla sombra. 100 a 150 g de material vegetal se secó en un horno a 60 °C hasta peso constante. Previo al análisis, el material seco se molió en un molino de acero inoxidable para obtener un polvo fino el cual se pasó a través de un tamiz malla 40. A 5 g de la harina de hoja se le aplicó el protocolo de extracción utilizado para el tubérculo del camote de cerro aplicando MC+EtOH80. Cada muestra se hizo por duplicado y los extractos secos obtenidos se resuspendieron a 1 mL con ciclohexano y se analizaron para diosgenina por CG-EM haciendo dos inyecciones por cada muestra.

Cuadro 5. Acciones de *Dioscorea* seleccionadas para análisis de diosgenina en hoja.

Localidad	No. Accesoión	Especie
Chapala	1	<i>D. sparsiflora</i>
Chapala	5	<i>D. remotiflora</i>
San Antonio (Chapala)	38	<i>D. sparsiflora</i>
Cocula	48	<i>D. sparsiflora</i>
Ixtlahuacán de los Membrillos	91	<i>D. sparsiflora</i>
Manzanilla de la Paz	205	<i>D. sparsiflora</i>
Manzanilla de la Paz	600-1	<i>D. sparsiflora</i>
Acatic	225	<i>D. remotiflora</i>
Ixtlahuacán del Río	261	<i>D. sparsiflora</i>
San Gabriel	307	<i>D. sparsiflora</i>
Zapotlanejo	359	<i>D. sparsiflora</i>
San Martín Hidalgo	471	<i>D. sparsiflora</i>
Autlán	421	<i>D. sparsiflora</i>

5.5 Características físicas y químicas de los tubérculos

5.5.1 Análisis físico del camote de cerro

Inmediatamente después de la cosecha del tubérculo de cada acción de las once localidades de Jalisco se les determinó longitud y peso (LT y PT), proporción pulpa/cáscara (P/C) y porcentaje de pulpa y cáscara (%P y %C, respectivamente). La longitud se determinó midiendo con cinta métrica todo el tubérculo; el peso se obtuvo pesando el tubérculo recién cosechado y limpio en una balanza granataria; la proporción pulpa/cáscara se determinó dividiendo el peso de la pulpa entre el peso de la cáscara al pesar por separado la pulpa y la cáscara. El porcentaje de pulpa y cáscara se determinó con el peso de cada uno dividido entre el peso total del tubérculo x 100.

5.5.2 Composición química del camote de cerro

Este análisis se llevó a cabo en fresco en material vegetal preparado con tubérculos de cinco accesiones de la misma localidad, excepto Cocula del que se utilizaron solo cuatro accesiones, que se mezclaron para formar una muestra única dando como resultado once muestras, cada una correspondiente a una de las once zonas de estudio. Las muestras se enviaron al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), en donde todas las determinaciones se desarrollaron de acuerdo a métodos oficiales de análisis: de acuerdo a la norma NMX-F-083-1986 se determinó humedad; proteínas totales (calculada a partir del contenido de nitrógeno, $N \times 6.25$) obtenida usando el método Kjeldahl, de acuerdo a NMX-F-608-NORMEX-2002; cenizas según NMX-F-607-NORMEX-2002, grasa mediante la obtención del extracto etéreo por el método Soxhlet según NMX-F-615-NORMEX-2004; fibra cruda según NMX-F-613-NORMEX-2003 y carbohidratos totales, calculados por diferencia de acuerdo a la AOAC 986.25 (AOAC, 1990).

5.6 Protocolo para la producción de callos *in vitro* en accesiones de *Dioscorea* del Estado de Jalisco.

Para ello se hicieron pruebas con diferentes genotipos, contenedores, explantes, tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento como cinetina (KIN), ácido naftalenacético (ANA), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA) y ácido picolínico (picloram), asimismo, se hicieron modificaciones en la concentración de la fuente de carbohidratos (sacarosa) y de elementos mayores del medio de cultivo MS. Los experimentos desarrollados fueron los siguientes:

1. *Fuente de carbohidratos vs elementos mayores*: De acuerdo a resultados observados en pruebas preliminares se estableció un experimento bifactorial basado en diferentes concentraciones de carbohidratos: 15, 20 y 25 gL⁻¹ de sacarosa y cuatro concentraciones de macronutrientes tomando como base al medio MS: 1/4, 1/2, 3/4 y 1. A su vez, cada tratamiento se preparó con dos diferentes reguladores, uno con 2 mgL⁻¹ de 2,4-D y el otro con 7.5 mgL⁻¹ de picloram. Se agregó 1 gL⁻¹ de polivinilpirrolidona (PVP) como antioxidante y 2 gL⁻¹ de phytigel. En cajas Petri conteniendo el medio, se colocaron como explantes, tres segmentos de tallo de plantas *in vitro* de camote de cerro de aproximadamente 1 cm de largo cortados a su vez en cinco partes de las accesiones 34 y 309, originarias de San Antonio y San Gabriel, respectivamente. Se hicieron seis repeticiones por tratamiento. La variable a medir fue el número de callos formados por caja entre los 45 y 50 días de establecido el experimento.
2. *Cinetina vs ácido indolacético*. Con el fin de observar la influencia de los reguladores de crecimiento en la formación de callos, se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de KIN: 0, 0.25, 0.5 y 0.75 mgL⁻¹ y tres de AIA: 0, 1 y 2 mgL⁻¹. El medio MS se preparó con 25 gL⁻¹ de sacarosa y con 2.5 mL/L de los elementos mayores, se agregó 7.5 mgL⁻¹ de picloram, 1 gL⁻¹ de PVP y 2 gL⁻¹ de phytigel. Se utilizaron cajas Petri y como explantes cuatro nudos y cuatro entrenudos de plantas *in vitro* de camote de cerro (haciendo

pequeños cortes sin separar) por caja de la accesión 34 originaria de San Antonio. La variable a medir fue el número de callos formados y la calidad del callo, en donde 3 = bueno, 2 = regular, 1 = malo y 0 = nada, entre los 45 y 50 días de establecido el experimento.

3. *Ácido indolacético vs picloram*. Conjuntando lo obtenido en los experimentos anteriores, se estableció este último para observar el efecto de la concentración de AIA a 0, 0.1, 0.4 y 1.0 mgL⁻¹ combinado con el picloram a 0, 0.1, 0.4 y 1.0 mgL⁻¹ en la formación del callo usando nudos como explantes. El medio MS se preparó con 25 gL⁻¹ de sacarosa y con 2.5 mL/L de los elementos mayores, se agregó 1 gL⁻¹ de PVP y 2 gL⁻¹ de phytagei[®]. Se colocaron cuatro nudos por caja de plantas *in vitro* de camote de cerro de la accesión 1 originaria de Chapala. En esta ocasión la variable a medir fue el número de callos formados por caja y la cantidad de cada callo (en mm²) entre los 45 y 50 días de establecido el experimento.

En todos los casos, las cajas se incubaron a 27 °C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y una intensidad lumínica de 1,500 luxes.

5.7 Análisis estadístico de los datos

Para evaluar el mejor método para la extracción de diosgenina, se aplicó un modelo lineal generalizado (GLM de SAS Institute, 1999) y la prueba Tukey ($\alpha = 0.05$) para evaluar diferencias entre medias. El análisis estadístico de los niveles de diosgenina y las características físicas de las accesiones de las diferentes localidades de Jalisco se llevó a cabo aplicando GLM y la prueba de Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). El análisis de los datos de los diferentes experimentos desarrollados para formación de callo en cultivo *in vitro* fueron evaluados usando como herramienta el método de análisis de varianza (ANVA) por medio del programa STATGRAPHICS® PLUS 4.0; en los casos en que se detectaron diferencias significativas, se realizó la comparación de medias con base a la prueba de diferencias mínimas significativas (DMS) ($\alpha = 0.05$).

VI RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Extracción y cuantificación de diosgenina en accesiones de camote de cerro

6.1.1 Protocolo para la extracción de diosgenina

En el análisis estadístico para el experimento *Método de extracción vs solvente*, se detectaron diferencias altamente significativas para el método de extracción ($p = 0.0000$) y para los solventes utilizados en el procedimiento de obtención de saponinas ($p = 0.0026$); adicionalmente, la interacción entre métodos de extracción y solvente resultó altamente significativa ($p = 0.0026$). Con base en este último resultado se aplicó un análisis GLM de los 16 tratamientos resultantes de combinar métodos de extracción y solventes; el análisis detectó diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p < 0.0001$). En el Cuadro 6 se observa que el valor promedio más alto corresponde al método de extracción MC y al solvente EtOH80 (0.034 mg/kg en base seca). El método de extracción MC a la temperatura ambiente de extracción empleada, es comparable a lo reportado por Qi *et al.* (2009) para obtener saponinas y sus agliconas en *Dioscorea zingiberensis* y por Lin *et al.* (2006) en *Dioscorea pseudojaponica*. A pesar del uso común de alcoholes de cadena corta y de mezclas acuosas con alcohol para la extracción de saponinas en *Dioscorea* (Taylor *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2003; Kaufmann *et al.*, 2007), fue de nuestro interés comparar la eficiencia de diferentes solventes en la extracción de diosgenina de tubérculos de camote de cerro seguido por la aplicación de una condición estándar de hidrólisis con ácido sulfúrico y así confirmar lo reportado por Taylor *et al.* (2000), quienes demostraron la efectividad del etanol acuoso al 80 % para recuperar la diosgenina en semillas de fenogreco.

Cuadro 6. Comparación de medias en la recuperación de diosgenina (mg/kg en base seca) utilizando diferentes métodos de extracción y solventes.

	ES	MC	MC-US	BA	Promedio
MeOH100	0.021bcd	0.019cd	0.020bcd	0.000e	0.015
EtOH70	0.000e	0.027abc	0.025abc	0.000e	0.013
EtOH80	0.031ab	0.034a	0.023abc	0.000e	0.022
PropOH70	0.010de	0.024abc	0.012d	0.000e	0.011
Promedio	0.015	0.026	0.020	0.000	

MeOH100, 100 % metanol; EtOH70, 70 % etanol acuoso; EtOH80, 80 % etanol acuoso; PropOH70, 70 % 2-propanol acuoso; ES, extracción en Soxhlet; MC, maceración; MC-US, maceración-ultrasonido; BA, baño en agua. Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes usando la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Recientemente, una técnica extractiva que está siendo desarrollada para la obtención de extractos naturales es el uso de solventes asistidos con ultrasonido. Esta aplicación depende del fenómeno acústico que se genere dentro del material que contiene los compuestos de interés causado por la penetración de vibraciones, lo que produce una cierta fragmentación del material en cuestión, que permite así un rápido contacto del solvente con las sustancias afines. En este trabajo, la aplicación de 5 minutos de ultrasonido durante el proceso de extracción solvente-harina desgrasada de camote de cerro, no resultó significativamente diferente en la recuperación de diosgenina al compararla con la extracción en ausencia de ultrasonido (Cuadro 6). El incremento en la potencia ultrasónica podría mejorar la recuperación del metabolito de interés. La aplicación de ondas de ultrasonido más utilizadas para extracción tiene intensidades de 1 a 1000 W/cm² (Shoh, 1988), sin embargo, existen trabajos como el realizado por Villa y Orozco, (2003) en el que demuestran que la aplicación de diferentes intensidades de ultrasonido para la extracción del pigmento del azafrán de bolita, no mejoró los rendimientos en la extracción. De igual manera, Valencia *et al.* (2011) concluyeron que la aplicación de ultrasonido no mostró diferencias significativas con otros

métodos de extracción (reflujo y Soxhlet) en la obtención de compuestos antioxidantes de *Guadua angustifolia* Kunth.

Por ser un procedimiento más sencillo de desarrollar y menos costoso, se seleccionó como protocolo para la extracción de diosgenina a MC como método de extracción y 80 % de etanol acuoso como solvente de extracción. El método MC+EtOH80, el cual fue modificado por Tostado (2012), en donde se disminuyó el tiempo de contacto harina desgrasada-solvente (1:28 p/v) a solo 6 h, realizando dos extracciones con 350 mL de solvente cada 3 h, se aplicó a la harina desgrasada de cada una de las 60 accesiones evaluadas del Estado de Jalisco.

6.1.2 Análisis cromatográfico

Las condiciones experimentales usadas para la cuantificación de diosgenina por GC-EM en las muestras de camote de cerro, presentaron patrones de fragmentación similares al estándar de diosgenina tomando como base al ion principal de m/z 139, apareciendo en un tiempo de retención aproximado de 17.63 min (Figura 8), lo que muestra las buenas condiciones analíticas del equipo. Los valores medios de diosgenina obtenidos para cada localidad se muestran en el Cuadro 7. Los niveles de diosgenina de las 60 accesiones de *Dioscorea* van de 0.02 mg/kg a 0.16 mg/kg en base seca, mostrando diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) entre las localidades. La concentración más baja de diosgenina (0.025 mg/kg) se obtuvo de tubérculos originarios de Autlán y los tubérculos con el valor más alto de diosgenina fueron de San Antonio (Chapala) (0.16 mg/kg) y de San Gabriel (0.12 mg/kg), siendo *D. sparsiflora* la misma especie de los tubérculos de cada una de las tres localidades. Aunque los niveles de diosgenina obtenidos en este trabajo se observan bajos, coinciden con lo reportado por Martin (1969), quien hace una lista de las especies de *Dioscorea* que ya han sido analizadas por su contenido en sapogeninas, mostrando que algunas presentan solo trazas de éstas. Hata *et al.* (2003) evaluaron el contenido de sapogeninas en variedades nativas de *Dioscorea* provenientes de Colombia, para las que obtuvieron valores promedio en el intervalo de 0 a 7.8 mg/100 g (en base seca), lo que mostró la existencia de variedades en las cuales la presencia

de sapogeninas y diosgenina es baja o prácticamente cero. En un trabajo realizado por Taylor *et al.* (2002) para determinar diosgenina en semillas de diferentes accesiones de fenogreco, aseguraron que los niveles de ésta estuvo afectada tanto por factores ambientales (origen) como genéticos, por lo que, a pesar, de que las plantas de camote de cerro en este proyecto fueron crecidas en las mismas condiciones ambientales y que la mayoría corresponde a la especie *D. sparsiflora*, el factor genético pudo ser relevante en las diferencias significativas observadas entre las accesiones de las diferentes localidades de Jalisco. Por otro lado, Shrum *et al.* (1958), en un trabajo realizado en tubérculos *D. floribunda* y *D. composita*, demostraron que en la cosecha del tubérculo en el segundo y tercer periodo anual, el contenido de diosgenina fue mayor que en los tubérculos cosechados en el primer periodo, además, en un estudio realizado por Hang *et al.* (2004), en diferente germoplasma de *D. zingiberensis*, se determinó que el contenido de diosgenina está fuertemente relacionado con el peso del tubérculo y Huai *et al.* (1989) demostraron que los factores climáticos están fuertemente relacionados con la biosíntesis de ésta.

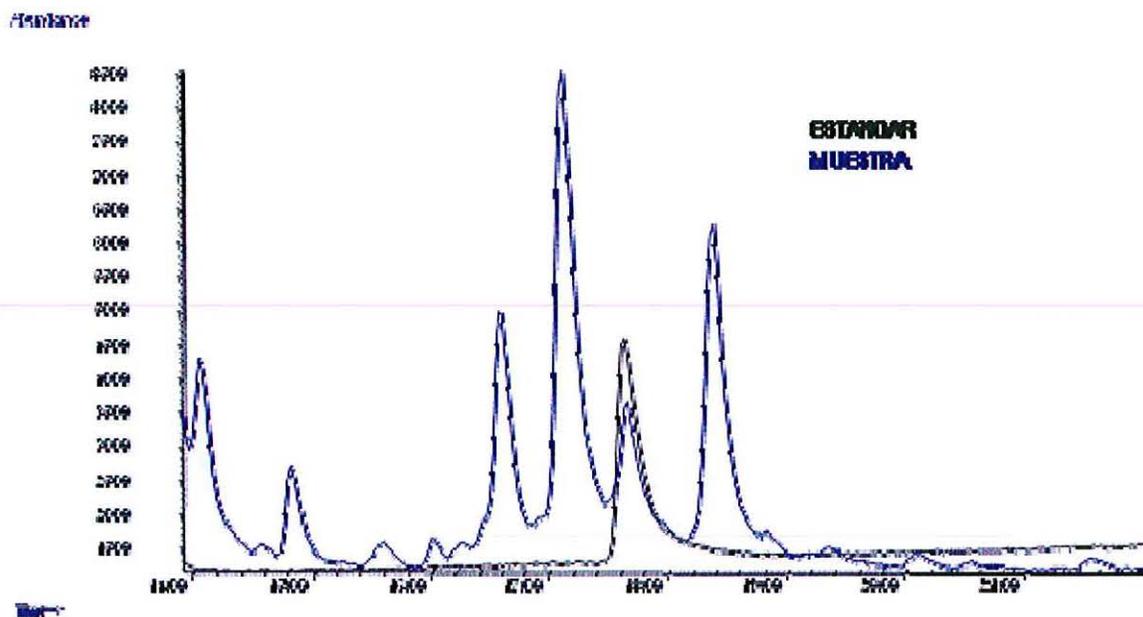


Figura 8. Cromatograma obtenido por CG-EM del estándar de diosgenina y de una muestra de extracto de camote de cerro originario de Acatic obtenido por el método de extracción MC+EtOH80.

Cuadro 7. Comparación de medias de los niveles de diosgenina (base seca) de las 60 accesiones de *Dioscorea* spp. provenientes de las once localidades del Estado de Jalisco.

Localidad	Observaciones	*Diosgenina (mg/kg)	C.V. (%)
Autlán	24	0.02a ± 0.008	33.1
Ixtlahuacán del Río	20	0.03ab ± 0.012	38.9
Cocula	16	0.04ab ± 0.017	45.2
Chapala	20	0.04ab ± 0.021	53.1
San Martín Hidalgo	20	0.05ab ± 0.036	75.7
Ixtlahuacán de los Membrillos	20	0.06abc ± 0.071	117.9
Zapotlanejo	20	0.07abc ± 0.053	77.1
Acatic	20	0.08abc ± 0.048	64.7
Manzanilla de la Paz	36	0.09bc ± 0.088	95.8
San Gabriel	24	0.12cd ± 0.064	55.4
San Antonio (Chapala)	20	0.16d ± 0.157	100.2
Media general		0.07 ± 0.077	

*Los datos mostrados son la media ± DE (desviación estándar). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes usando la prueba de Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$).

Durante el análisis por CG-EM de las muestras desgrasadas de camote de cerro, se detectaron tres fitoesteroles alrededor del espectro de diosgenina (Figura 9) que fueron tentativamente identificados con la base de datos espectral del equipo (Apéndice A1), NIST05L A.01.00, como: campesterol, stigmasterol y β -sitosterol. Cabe destacar que el contenido de esteroides ya se ha reportado en muchas especies de *Dioscorea* (Opute y Osagie, 1978; Muzac-Tucker *et al.*, 1993) y el β -sitosterol también ha sido identificado en semilla de fenogreco (Taylor *et al.*, 1997; 2002) Los fitoesteroides tienen una estructura similar a la del colesterol y se sabe que producen efectos hipocolesterolemicos, además de tener propiedades antiinflamatorias, antitumorales, bactericidas y fungicidas, lo que los hace

importantes aliados en la prevención de enfermedades y actualmente constituyen un modelo muy adecuado para el desarrollo de alimentos funcionales (Valenzuela y Ronco, 2004). También, ácidos grasos como el ácido linoléico y el ácido linolénico se han aislado de tubérculos de *Disocorea* por Xu *et al.* (2008).

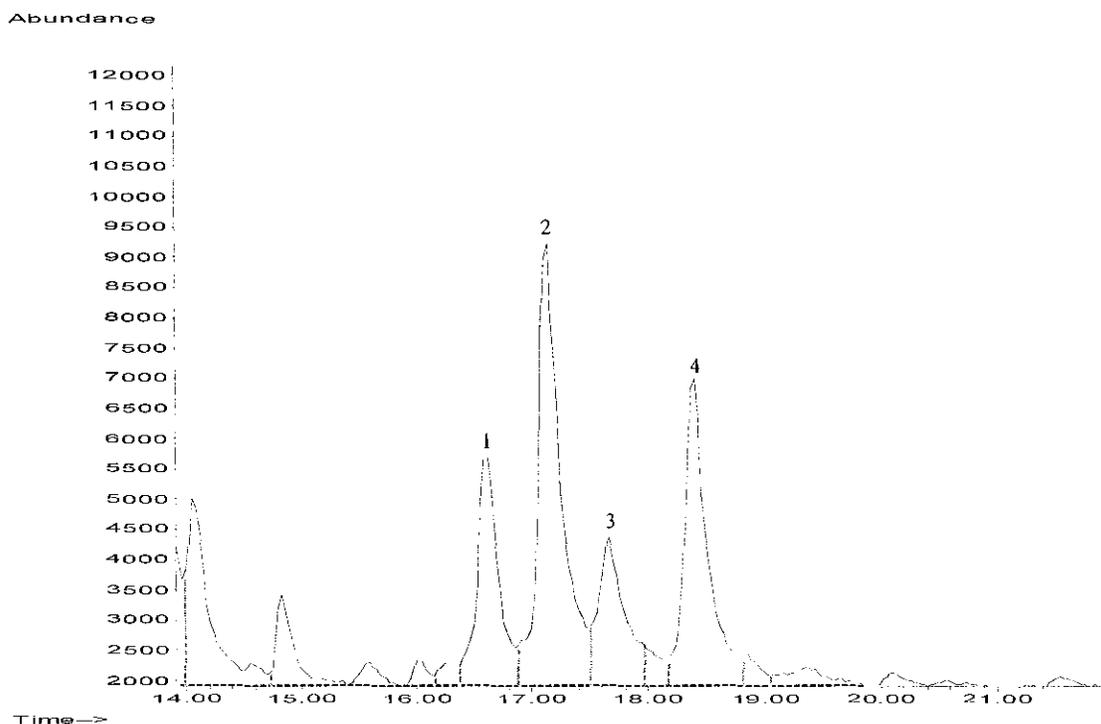


Figura 9. Cromatograma de un extracto de camote de cerro de la accesión 239, en donde, de acuerdo a la base de datos de espectros del equipo de CG-EM (NIST05L A.01.00): 1 = campesterol, 2 = stigmasterol, 4 = β -sitosterol; y de acuerdo al estándar de diosgenina, 3 = diosgenina.

6.2 Análisis de diosgenina en hojas de plantas de *Dioscorea*

Los valores medios de diosgenina en hoja obtenidos por CG-EM para cada localidad se muestran en la Cuadro 8. Los niveles de diosgenina de las accesiones de *Dioscorea* van de 0 a 3.33 mg/kg en base seca, mostrando diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) entre las localidades. La concentración más baja de diosgenina (0 mg/kg) se obtuvo de hojas provenientes de plantas originarias de Autlán, misma localidad en la que los tubérculos de camote de cerro presentaron el valor más bajo en diosgenina; las hojas con el valor más alto en diosgenina fueron de Zapotlanejo (3.33 mg/kg), lo cual no coincide con el origen del valor más alto de diosgenina en tubérculos de camote de cerro. En la determinación de saponinas en distintos órganos de *D. pseudojaponica*, Lin y Yang (2008) obtuvieron altas concentraciones en corteza la cual fue más alta que la obtenida en pulpa y ésta a su vez, más alta que en hojas (24.41 $\mu\text{g/g}$ en base seca) y ésta, mayor que en tallos. Este comportamiento, contrario a lo obtenido en este trabajo, en donde los niveles de diosgenina en hoja resultaron más altos que los obtenidos en el tubérculo, confirma la aseveración de Dinan *et al.* (2001) que indican que pueden existir variaciones considerables en el contenido de saponinas y sapogeninas (principalmente cuantitativas) en los diferentes órganos de las plantas. Además, Bennett *et al.* (1963) encontraron que el principal sitio de la biosíntesis de esteroides se encuentra en el vástago de la planta de *Dioscorea*, principalmente en la hoja (Vendl *et al.*, 2006) y que en la senescencia de ésta los esteroides son trasladados al tubérculo. Sin embargo, en otras especies como *Solanum chamaeacanthum*, los tallos y hojas son la fuente de sapogeninas esteroidales, como la chamagenina (Basterrechea *et al.*, 2000); en agaváceas, sapogeninas como la yamogenina y la diosgenina son aisladas de sus hojas (Hernández *et al.*, 2005; Orestes *et al.*, 2008) y en fenogreco, a partir de las semillas de la planta (Taylor *et al.*, 1997, 2000 y 2002). Asimismo, Lin y Yang (2008) mencionan que hasta el momento no hay informes exhaustivos sobre la variación del contenido de saponina en diferentes órganos de plantas de *Dioscorea*. Esta aseveración ubica a este trabajo como portador de nuevos conocimientos, así como, despierta el interés en la realización de futuros trabajos

relacionados con la determinación de diosgenina en diferentes partes de la planta de camote de cerro, así como en diferentes etapas de desarrollo de la misma.

Cuadro 8. Comparación de medias de los niveles de diosgenina (base seca) en hojas de accesiones de *Dioscorea* spp. provenientes de las once localidades del Estado de Jalisco.

Localidad	Observaciones	*Diosgenina (mg/kg)
Autlán	4	0.00a ± 0.000
San Martín Hidalgo	4	0.14a ± 0.072
Acatic	4	0.25a ± 0.018
Ixtlahuacán de los Membrillos	4	0.72ab ± 0.052
Chapala	8	0.93bc ± 0.706
Cocula	4	1.38bcd ± 0.074
San Antonio (Chapala)	4	1.52cde ± 0.088
Ixtlahuacán del Río	4	1.84def ± 0.129
Manzanilla de la Paz	8	2.07ef ± 0.156
San Gabriel	4	2.53f ± 0.084
Zapotlanejo	4	3.33g ± 0.324

*Los datos mostrados son la media ± DE (desviación estandar). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes usando la prueba de Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$).

6.3 Propiedades físicas y químicas de tubérculos de camote de cerro

6.3.1 Características físicas

Después de la cosecha de los tubérculos de las 60 accesiones de *Dioscorea* spp. que fueron establecidos en un vivero de malla sombra bajo las mismas condiciones de cultivo, fueron evaluadas diferentes características físicas. El análisis estadístico de dichas características se presenta en el Cuadro 9. El largo, peso y la proporción pulpa/cáscara del tubérculo demostraron diferencias estadísticas altamente significativas ($p = 0.0020$, $p = 0.0023$ y $p = 0.0083$, respectivamente) entre las accesiones de diferente origen geográfico. Los tubérculos de San Gabriel fueron los que tuvieron un mayor peso y longitud, 1,449.67 g y 5.14 m, respectivamente; mientras que San Martín Hidalgo y Autlán mostraron los más bajos promedios en el peso y la longitud de los tubérculos (471.20 g y 2.28 m; 545.33 g y 1.18 m, respectivamente). Para la relación pulpa/cáscara, Autlán presentó el valor promedio más alto (6.9) e Ixtlahuacán de los Membrillos mostró el valor promedio más bajo (4.44), lo que significa que los tubérculos cuyo origen es Autlán tiene una mayor porción comestible (86.48 %), sin embargo, en Jalisco el camote de cerro es consumido por los habitantes de la región sólo cocido sin eliminar la cáscara lo que hace que la porción comestible sea del 100 %, como lo confirma Guizar *et al.* (2008) en un trabajo realizado en *D. remotiflora* y *D. sparsiflora*. Por otro lado, el porcentaje de pulpa (%P) y cáscara (%C) fue diferente significativamente entre las localidades ($p = 0.0217$ y $p = 0.0334$, respectivamente). Autlán tiene el %P más alto y %C más bajo siendo estadísticamente diferentes a la Manzanilla de la Paz para ambas características. Lebot *et al.* (2006) consideran que algunas de las características físicas externas del tubérculo no siempre garantizan la calidad de las propiedades organolépticas del mismo. De manera coincidente con la accesiones de camote de cerro aquí evaluadas, en un estudio de variabilidad morfológica en especies de yam originarias de Kenia, Mwirigi *et al.* (2009) mostraron que determinadas características de la parte aérea de la planta así como de la parte subterránea, específicamente del tubérculo, presentaron importante variabilidad morfológica,

atribuido, de acuerdo a estos autores, al origen de la muestra así como al genotipo, sin embargo, mencionan que las especies de *Dioscorea*, comparado con el maíz, son menos vulnerables a cambios climáticos y que estos estudios pueden ser usado para seleccionar variedades con mayor rendimiento, además de ser útiles para la planificación de la conservación y el mejoramiento genético del cultivo.

Cuadro 9. Comparación de medias de las características físicas de las 60 accesiones de camote de cerro originarias de once localidades del Estado de Jalisco.

Localidad	PT (g)	LT (m)	%P	%C	P/C
Acatic	916.80abc ± 413.5	3.45ab ± 2.12	82.46ab ± 1.72	16.99ab ± 1.56	4.89ab ± 0.51
Autlán	545.33ab ± 60.5	1.18a ± 0.51	86.48b ± 1.18	12.57a ± 0.58	6.89b ± 0.38
Chapala	1082.40abc ± 597.2	2.59ab ± 0.95	82.70ab ± 3.26	16.66ab ± 2.95	5.15ab ± 1.35
Cocula	1261.00abc ± 372.5	3.38ab ± 1.58	85.05ab ± 1.48	13.75ab ± 1.18	6.23ab ± 0.61
Ixtlahuacán del Río	1378.80bc ± 325.9	3.60ab ± 0.58	83.30ab ± 2.87	15.76ab ± 2.87	5.44ab ± 1.08
Ixtlahuacán de los Membrillos	1166.40abc ± 372.1	3.11ab ± 0.56	80.30ab ± 2.96	18.42ab ± 2.87	4.45a ± 0.76
Manzanilla de la Paz	1247.55bc ± 543.8	2.95ab ± 1.19	78.41a ± 6.86	18.18b ± 4.49	4.57a ± 1.23
San Antonio (Chapala)	1320.00abc ± 201.1	3.59ab ± 0.39	83.83ab ± 1.15	15.34ab ± 1.35	5.50ab ± 0.54
San Gabriel	1449.66c ± 636.0	5.14b ± 2.28	81.90ab ± 3.21	16.95ab ± 3.12	5.07ab ± 1.55
San Martín Hidalgo	471.20a ± 119.6	2.28a ± 1.39	82.38ab ± 2.45	17.24ab ± 2.40	4.87ab ± 0.82
Zapotlanejo	1102.40abc ± 162.6	3.74ab ± 1.26	82.64ab ± 3.27	16.63ab ± 3.32	5.18ab ± 1.33

*Los datos mostrados son la media ± DE (desviación estándar). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes usando la prueba de Tukey-Kramer ($\alpha = 0.05$). PT, peso del tubérculo; LT, longitud del tubérculo; %P, porcentaje de pulpa; %S, porcentaje de cáscara; P/C, proporción pulpa/cáscara

6.3.2 Composición química

El resultado de los análisis químicos se presenta en la Cuadro 10. El porcentaje de humedad osciló en un rango entre 71.93-83.26 %, la proteína cruda entre 1.42-1.74 %, las cenizas entre 0.80-1.16 %, la grasa va desde 0.13-0.17 %, la fibra cruda y los carbohidratos totales fluctúan entre 3.80-4.02 % y 13.97-25.44 %, respectivamente. Los valores encontrados en el presente estudio son parecidos a reportados en investigaciones anteriores en tubérculos de diferentes especies de *Dioscorea* (Bhandari *et al.*, 2003; Shajeela *et al.*, 2011). Bhandari *et al.* (2003) reportaron el contenido de fibra cruda (0.6 a 1.5 % del peso fresco) en cuatro especies de ñame silvestre de Nepal, siendo los valores más bajos que los reportados para el camote de cerro aquí evaluado. En papa, batata, yuca y malanga se presentan contenidos similares de proteína pero con una menor cantidad de fibra (Burlingame *et al.*, 2009). En un estudio hecho por la FAO (1995), para el contenido de nutrientes en alimentos seleccionados, se reporta que cada 100g de yam fresco proporciona 118 kcal, 1.5 g de proteína y 0.2 g de grasa entre otros nutrientes, pero estos valores pueden variar según la especie o variedad. La selección de las características externas por sí solas no pueden garantizar la calidad de las propiedades organolépticas, pero cuando las accesiones con quimiotipos adecuados son combinadas con una variedad de tubérculo que posee atractivas características físicas, pudieran obtenerse alimentos con características interesantes para los consumidores (Lebot *et al.*, 2006). El contenido elevado de carbohidratos, la importante cantidad de fibra y la baja proporción de grasas, hacen que los tubérculos de camote de cerro del Estado de Jalisco provean los requerimientos dietéticos necesarios para quienes lo consumen, dándole aplicaciones como complemento nutricional o para incluirse en la formulación de dietas.

Cuadro 10. Composición química (% en fresco) de tubérculos de camote de cerro originarios de las once localidades del Estado de Jalisco.

Localidad	Humedad	Proteína	Ceniza	Grasa	Fibra cruda	Carbohidratos Totales
Acatic	78.38	1.56	0.84	0.15	3.88	19.08
Autlán	73.26	1.42	1.16	0.17	3.90	23.99
Chapala	80.93	1.49	0.95	0.13	3.88	16.49
Cocula	78.29	1.46	0.99	0.15	3.81	19.11
Ixtlahuacán del Río	77.59	1.46	0.88	0.16	3.80	19.91
Ixtlahuacán de los Membrillos	71.93	1.62	0.87	0.14	3.95	25.44
Manzanilla de la Paz	81.65	1.48	0.93	0.16	3.86	15.78
San Antonio (Chapala)	80.98	1.50	0.93	0.16	4.02	16.43
San Gabriel	75.69	1.74	1.02	0.16	3.99	21.39
San Martín Hidalgo	83.26	1.66	0.96	0.15	3.85	13.97
Zapotlanejo	74.45	1.56	0.89	0.15	3.95	22.89
Máximo	83.26	1.74	1.16	0.17	4.02	25.44
Mínimo	71.93	1.42	0.80	0.13	3.80	13.97
Promedio	78.17	1.53	0.95	0.15	3.90	19.19

6.4 Protocolo para formación de callo *in vitro* de camote de cerro

6.4.1 Evaluación de los componentes del medio de cultivo, reguladores de crecimiento y genotipo

En este experimento en el número de callos formados por unidad experimental (caja Petri), no hubo diferencias significativas en los siguientes factores evaluados: concentración de sacarosa con un valor de $p = 0.2904$, elementos mayores del medio basal MS con $p = 0.4304$, accesiones con $p = 0.1367$ y tipo de regulador utilizado con $p = 0.4197$ (Apéndice A2); adicionalmente, la interacción entre los factores evaluados no fue significativa. Como ejemplo, en la Figura 10 se pueden apreciar las características de callos formados en este experimento a los 50 días de establecido. En general, fueron de color claro y consistencia suave, pero de tamaño pequeño y poco friables. Los callos son una formación desorganizada (desdiferenciada) de un grupo de células, resultado de una alta actividad mitótica de células diferenciadas en respuesta a un estímulo. La mayoría de los tejidos requieren de uno o más factores de crecimiento para estimular el desarrollo de los callos, entre estos factores se encuentran los componentes del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento o factores físicos como el manejo del fotoperiodo, la temperatura además del genotipo (Dodds y Roberts, 1990). Diversos trabajos, orientados a la formación de callos de especies de *Disocorea*, modifican la concentración de los elementos mayores del medio basal MS, la concentración de la fuente de carbono, así como, el tipo y concentración de reguladores de crecimiento. Chen *et al.* (2003), Zhu *et al.* (2009) indujeron la formación de callo en explantes de *Dioscorea zingiberensis* Wright modificando los macroelementos a la mitad del medio basal MS y la fuente de carbono a 20 gL^{-1} de sacarosa, utilizando bencilaminopurina (BAP) y ácido naftalenacético (ANA) como reguladores, en cambio, en la misma especie, Heping *et al.* (2008) utilizaron el medio MS sin modificar, complementado con 3% (p/v) de sacarosa con BAP y AIA. Sin embargo, Gómez (2011) obtuvo callos de especies de *Dioscorea* originarias del Estado de Jalisco utilizando el medio MS con la mitad de los macroelementos y 25 gL^{-1} de sacarosa con benciladenina (BA) y ácido

2,4,5-tricloro-fenoxiacético (2,4,5-T). Hasta el momento, no existen trabajos relacionados con la micropropagación de *Dioscorea sparsiflora* y el único trabajo publicado para morfogénesis de *Dioscorea remotiflora* (Bernabé *et al.*, 2012), logró la formación de callos en el medio basal MS adicionado con 3 % (p/v) de sacarosa, sugiriendo que la calidad del callo podía ser mejorada. Con estos resultados se propuso como medio de cultivo para el siguiente experimento, el medio basal MS con $\frac{1}{4}$ de los elementos mayores, adicionando 25 gL^{-1} de sacarosa como fuente de carbono y la accesión 34 por contar con suficiente material vegetal, modificando el tipo de regulador de crecimiento.

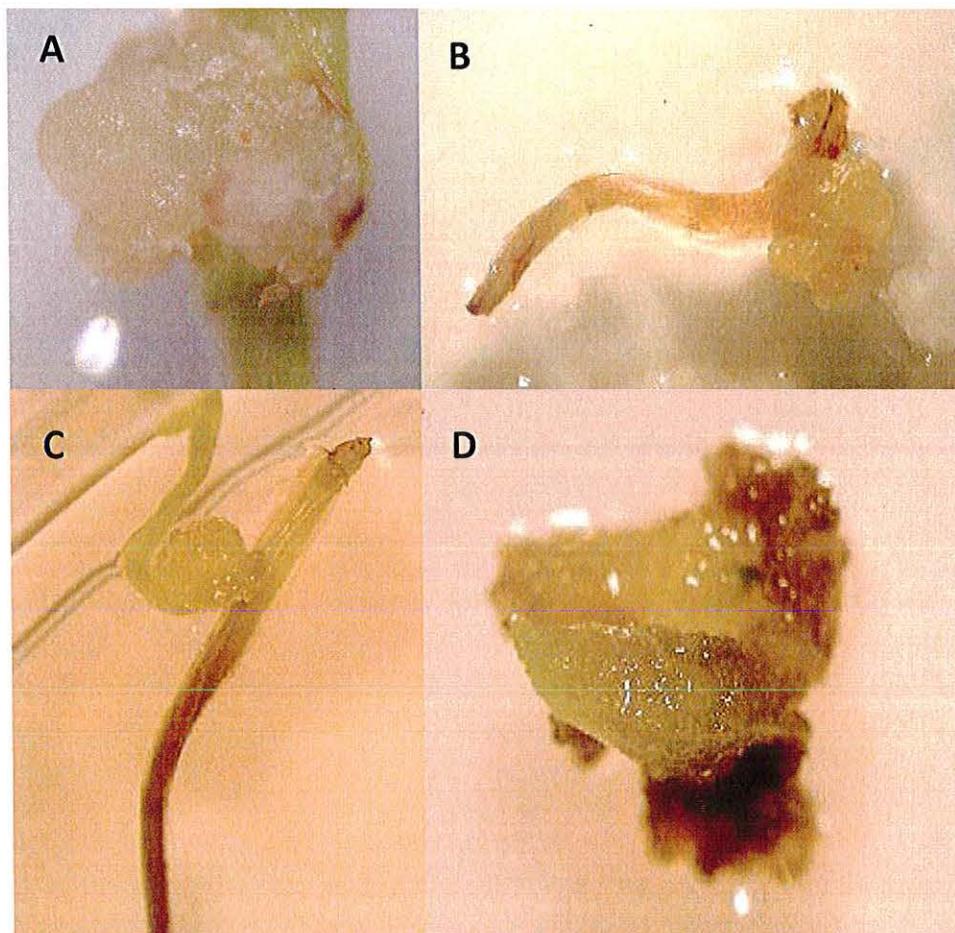


Figura 10. Características de los callos *in vitro* formados a partir de tallos de plantas *in vitro* de camote de cerro: A) callo color claro, B) callo de tamaño pequeño, C) callo de consistencia suave, D) callo poco friable.

6.4.2 Efecto de los reguladores de crecimiento y el tipo de explante

En el análisis de varianza de este experimento, no hubo diferencias significativas para los reguladores de crecimiento KIN y AIA, tanto para número de callos como para calidad del callo (ver Apéndice A3 y A4), pero sí hubo diferencias altamente significativas para el tipo de explante, tanto en el número de callos formados como para calidad del callo presentando un valor de $p = 0.0000$ y $p = 0.0000$, respectivamente; adicionalmente, la interacción entre los factores evaluados para las dos variables no fue significativa. En el Cuadro 11 y 12 podemos observar que los nudos con un meristemo formaron mayor número de callos y con mejor calidad, respectivamente, que los explantes provenientes de tallo (Figura 11). En este estudio se apreció la efectividad, tanto de KIN como de AIA, en la formación de callos a partir de nudos de plantas de camote cerro *in vitro*. Narula *et al.* (2005), utilizaron con éxito estos dos reguladores en el medio de cultivo MS con 3 % (p/v) de sacarosa en *Disocorea bulbifera*. Se dice que es importante que el medio de cultivo tenga un buen equilibrio de citocininas y auxinas para lograr obtener callos en crecimiento activo (Dodds y Roberts, 1990). Está comprobado que diferentes tejidos responden en forma distinta a iguales concentraciones de un mismo regulador de crecimiento habiéndose observado que la respuesta depende de la edad y de su estado fisiológico así como del genotipo (Mineo, 1990). Amir *et al.* (2013) y Bernabé *et al.* (2012), obtuvieron de manera exitosa, callos a partir de segmentos nodales de *Dioscorea deltoidea* y *Disocorea remotiflora*, respectivamente. Es importante resaltar que en la mayoría de los casos, los callos formados en este estudio eran de apariencia poco friable, ligeramente suaves y, a pesar de haber utilizado antioxidantes, tenían un color amarillento parduzco (Figura 11). Hay muchos trabajos de investigación que relacionan al genotipo con la formación de compuestos fenólicos, responsables del oscurecimiento de los callos además de retardar el crecimiento de las células; existen antioxidantes tales como ácido ascórbico que puede ser utilizado para disminuir la acumulación de estos compuestos en los cultivos (Amir *et al.*, 2013) o la combinación de éste con ácido cítrico y PVP (Bernabé *et al.*, 2012). Por lo anterior, la accesión 34 no es recomendable para la formación de callos *in vitro*.

Cuadro 11. Comparación de medias del número de callos formados con diferentes explantes.

Explante	Número de callos
Tallo	0.04a ± 0.09
Nudo	0.84b ± 0.18

*Los datos mostrados son la media ± DE (desviación estándar). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes usando la prueba de DMS ($\alpha = 0.05$).

Cuadro 12. Comparación de medias para calidad de callos formados con diferentes explantes.

Explante	Calidad de callo
Tallo	0.04a ± 0.012
Nudo	1.79b ± 0.56

*Los datos mostrados son la media ± DE (desviación estándar). Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes usando la prueba de DMS ($\alpha = 0.05$).

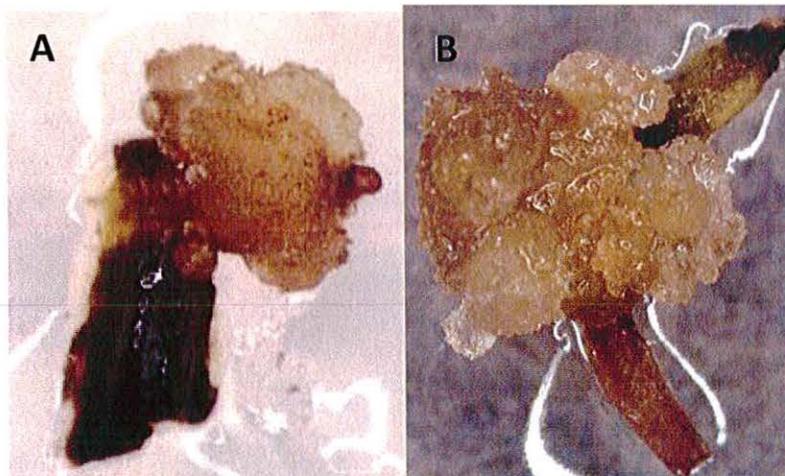


Figura 11. Comparación de medias para calidad de callos formados con diferentes explantes.

6.4.3 Influencia de las auxinas en la generación de callos

En el presente experimento, hubo diferencias altamente significativas en cantidad de callo para AIA y picloram con un valor de $p = 0.0015$ y $p = 0.0001$, respectivamente, sin embargo, para número de callos formados sólo hubo alta significancia en el uso del picloram con $p = 0.0000$ (Apéndice A5 y A6); adicionalmente, la interacción entre los factores evaluados para las dos variables no fue significativa. Haciendo el análisis de la comparación múltiple de medias para la cantidad de callo generado utilizando AIA, es posible obtener los mismos y mejores resultados con concentraciones de 0 y 0.4 mgL^{-1} del regulador (Cuadro 13), observándose el mismo efecto al adicionar al medio picloram a concentraciones de 0.1 y 0.4 mgL^{-1} (Cuadro 14). En cambio, niveles de picloram de 0.1, 0.4 y 1 mgL^{-1} incrementaron el número de callos por contenedor (Cuadro 15). Las propiedades físicas que caracterizan a los callos formados bajo las condiciones antes mencionadas son la de callos más grandes, friables, suaves y cristalinos (Figura 12); siendo importante resaltar el efecto positivo de la solución antioxidante, como lo reportan Bernabé *et al.* (2012) y que la accesión 1 de camote de cerro es recomendable para formación de callos *in vitro*.

Cuadro 13. Comparación de medias para cantidad de callo (mm^2) con diferentes concentraciones de AIA.

AIA (mgL^{-1})	Cantidad de callo
1	4.93a \pm 7.75
0.1	6.65ab \pm 8.60
0	8.13bc \pm 7.62
0.4	10.06c \pm 10.35

*Los datos mostrados son la media \pm DE (desviación estándar). Medidas con la misma letra no son significativamente diferentes usando la prueba de DMS ($\alpha = 0.05$).

Cuadro 14. Comparación de medias para cantidad de callo (mm^2) con diferentes concentraciones de picloram.

Picloram (mgL^{-1})	Cantidad de callo
0	4.18a \pm 6.44
1	6.67ab \pm 5.78
0.4	9.18bc \pm 9.32
0.1	9.74c \pm 11.39

*Los datos mostrados son la media \pm DE (desviación estándar). Medidas con la misma letra no son significativamente diferentes usando la prueba de DMS ($\alpha = 0.05$).

Cuadro 15. Comparación de medias para número de callos formados con diferentes concentraciones de picloram.

Picloram (mgL^{-1})	Cantidad de callo
0	$2.1a \pm 0.50$
1	$3.5b \pm 0.33$
0.1	$3.8b \pm 0.21$
0.4	$3.9b \pm 0.15$

*Los datos mostrados son la media \pm DE (desviación estándar). Medidas con la misma letra no son significativamente diferentes usando la prueba de DMS ($\alpha = 0.05$).

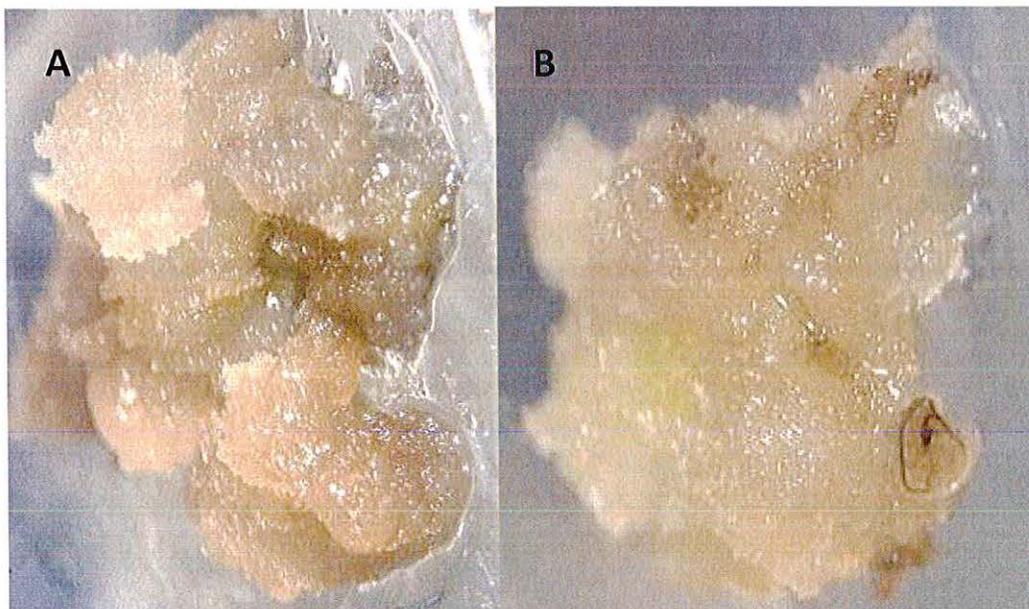


Figura 12. Callos *in vitro* formados a partir de explantes de nudo de plantas de camote de cerro *in vitro* en el experimento ácido indolacético vs picloram con las siguientes condiciones A) AIA = 0 mgL^{-1} y PIC = 0.1 mgL^{-1} ; B) AIA = 0.4 mgL^{-1} y PIC = 0.1 mgL^{-1} .

El picloram es una auxina sintética muy eficiente para el cultivo de tejidos vegetales, puesto que ofrece ciertas ventajas en relación con otras auxinas sintéticas como el 2,4-D, por ser soluble en agua, menos tóxica, efectiva a concentraciones más bajas y, en último lugar, por ofrecer un mayor potencial para la regeneración de plantas a partir de callos (Collins *et al.*, 1978). Al igual que en este experimento, el picloram incrementó el desarrollo del callos *in vitro* en explantes de *Triticum aestivum* L. (Mendoza y Kaeppler, 2002) y es considerado buen iniciador de callos embriogénicos en explantes de *Ananas comosus* L. (Sripaoraya *et al.*, 2003) y en *Bactris gasipaes* Kunth (Steinmacher *et al.*, 2007).

Con los resultados obtenidos se propone como protocolo para la obtención de callos *in vitro* de plantas de *Dioscorea* originarias del Estado de Jalisco, un medio basal MS con las siguientes modificaciones:

- $\frac{1}{4}$ de elementos mayores
- 25 gL^{-1} de sacarosa

Adicionando al medio:

- Ácido indolacético (AIA): 0.4 mgL^{-1}
- Picloram: 0.1 mgL^{-1}
- Polyvinylpyrrolidone (PVP): 1 gL^{-1}
- Phytigel: 2 gL^{-1}

Nudos como explantes y cada explante se debe bañar con una solución antioxidante preparada con ácido cítrico (100 mgL^{-1}) y ácido ascórbico (100 mgL^{-1}) antes de colocarlo en el medio. Los cultivos bajo condiciones de incubación a 27°C de temperatura, un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y una intensidad lumínica de 1500 luxes.

VII CONCLUSIONES

Las investigaciones acerca del solvente de extracción y el método de extracción, nos permitieron proponer un protocolo para la obtención de diosgenina en accesiones de camote de cerro del Estado de Jalisco en donde, la concentración de etanol acuoso al 80 % y maceración por 6 h, haciendo dos extracciones de 350 mL cada 3 h, desempeñaron un papel importante, en la eficiencia de extracción de diosgenina. Las condiciones del GC-EM y la columna capilar HP-5MS fueron particularmente útiles para la separación de diosgenina en los extractos además de ser eficiente y relativamente rápido.

Los valores más altos de diosgenina en las accesiones de Jalisco se encontraron en tubérculos de las localidades de San Antonio y San Gabriel, sin embargo, Zapotlanejo presentó el valor más alto en hoja. En el futuro, sería importante realizar trabajos en los que se evalúe el contenido de diosgenina de los diferentes genotipos de camote de cerro del Estado de Jalisco en diferentes periodos de cosecha y distintas condiciones climáticas.

Las diferencias encontradas entre accesiones para las propiedades físicas de los tubérculos están asociadas en mayor grado con el origen geográfico; las accesiones de San Gabriel fueron las de mayor rendimiento mientras que los tubérculos de Autlán proporcionan mayor porción comestible. En general, se observa que la mayoría de las accesiones evaluadas resultaron ser una buena fuente de proteína, fibra cruda, cenizas y carbohidratos.

La importancia de determinar las características físicas y químicas de las especies de *Dioscorea*, podrían contribuir a la selección de un genotipo ideal para los consumidores. Estos estudios, pueden colocar o considerar a los tubérculos de *Dioscorea* como alimentos funcionales, ya que no solo podrían resolver problemas de enfermedades crónicas que ahora prevalecen en casi todos los países, sino también, fomentar la industria y motivar a los colectores al establecimiento de este género como un cultivo incrementando su producción para elaborar productos con valor añadido y saludables.

Los experimentos planteados en este proyecto nos permitieron establecer un protocolo para formación de callo en cultivo *in vitro* de camote de cerro. La característica más importante de los callos, desde un punto de vista funcional, es que este crecimiento anormal de células tiene el potencial para desarrollar raíces, tallos y embriones que pueden a su vez formar plantas, además de tener aplicación en la ingeniería genética para la obtención de transgénicos. En otros protocolos, el callo se genera para su uso en procedimientos biotecnológicos tales como la formación de cultivos en suspensión de la que metabolitos de importancia económica y de salud, pueden ser obtenidos.

VIII LITERATURA CITADA

- Acosta, EMC. 1987. El cultivo del Ñame *Dioscorea* sp. 2ª ed. TOA. Santa Fe de Bogotá, Colombia. p. 79.
- Akoroda, M.O. 1983. Principal component analysis and metroglyph of variation among Nigerian yellow yams. *Euphytica*. 32, 565-573.
- Álvarez, A. 2000. Prácticas agronómicas para el cultivo del ñame. En: ñame: producción de semillas por biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. pp. 33-39.
- Amir, M., Mujeeb, M., Ahmad, A., Ahmad, S., Usmani, S., Ashraf, K. 2013. *In vitro* propagation and diosgenin quantification by HPLC in callus culture and plant part of *Dioscorea deltoidea*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 1-4.
- Ammirato, P. 1984. Yams. In: Handbook of plant cell tissue and organ culture. Ammirato, P., Evans, D., Sharp, W. Ed. Unit for advance propagation system. Department of Horticulture, Agriculture and Environmental. University of London. p. 619.
- AOAC. 1990. Official methods of analyses. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, USA.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C., Restrepo, J. 2009. Aspectos ingenieriles del cultivo *in vitro* de células vegetales para la producción de metabolitos secundarios. *Dyna*. 157, 109-121.
- Asiedu, R., Sartie, A. 2010. Crops that feed the World 1. Yam. Yams for income and food security. *Food Sec.* 2, 305-315.
- Balogun, M.O. 2009. Microtubers in yam germplasm conservation and propagation: The status, the prospects and the constraints. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 4, 1-10.
- Basterrechea, R.M.J., Ferrer, H.A., Calzadilla, G.M., Navarro, F.A.E., Pérez, C. 2000. Componentes esteroidales del *Solanum chamaeacanthum* Griseb. Parte II.

Chamagenina, una nueva sapogenina esteroidal. *Ciencias Naturales y Agropecuarias*. 7, 266-268.

- Benavides, M.A., Hernández, V.R.E.M., Ramírez, R.H., Sandoval R.A. 2010. Tratado de botánica económica moderna. UAAAN. Coahuila, México. pp. 1-15.
- Bennett, R.D., Heftmann, E., Preston Jr., W.H., Haun, J.R. 1963. Biosynthesis of sterols and sapogenins in *Dioscorea spiculiflora*. *Arch. Biochem. Biophys.* 103, 74-83.
- Bernabé, A., Santacruz, R.F., Cruz, S. 2012. Effect of plant growth regulators on plant regeneration of *Dioscorea remotiflora* (Kunth) through nodal explants. *Plant Growth Regul.* 68, 293–301.
- Bhalla, R., Narasimhan, K., Swarup, S. 2005. Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant Cell Rep.* 24, 562-571.
- Bhandari, M.R., Kasai, T., Kawabata, J. 2003. Nutritional evaluation of wild yam (*Dioscorea* spp.) tubers of Nepal. *Food Chem.* 82, 619-623.
- Borges, M., Ceiro, W., Meneses, S., Aguilera, N., Vázquez, J., Infante, Z., Fonseca, M. 2004. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76, 87-90.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science.* 161, 839-851.
- Brachet A., Christen P., Gauvrit J-Y, Longerey R., Lantéri P., Veuthey J-L. 2000. Experimental design in supercritical fluid extraction of cocaine from coca leaves. *J. Biochem Biophys. Meth.* 43, 353-366.
- Budzikiewicz, H., Djerassi, C., Williams, D. 1964. Structure elucidation of natural products by mass spectroscopy. Vol II: Steroidal sapogenins. Ed Holden-Day. 2da. Edición. San Francisco. California. p. 110.

- Burlingame, B., Charrondiere, R., Mouille, B. 2009. Food composition is fundamental to the cross-cutting initiative on biodiversity for food and nutrition. *J. Food Compos. Anal.* 22, 361-365.
- Cabrera, M.; Torres, Y.; Santos, A.; Basail, M.; Rayas, A.; Medero, V.; Robaina, A.; López, J.; García, M.; Ventura, J.C.; Gutiérrez, V.; Otero, E.; Bauta, M.M. 2003. Establecimiento y multiplicación *in vitro* del clon de ñame blanco de Guinea (*Dioscorea rotundata* Poir). INIVIT. Villa Clara, Cuba. pp 7.
- Camel, V. 2001. Recent extraction techniques for solid matrices-supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *Analyst.* 126, 1182-1193.
- Chen, Y., Fan, J., Yi, F., Luo, Z., Fu, Y. 2003. Rapid clonal propagation of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 73, 75-80.
- Chen, Y.T., Kao, W.T., Lin, K.W. 2008. Effects of pH on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars. *Food Chem.* 107, 250–257.
- Collins, G.B., Vian, W.E., Phillips, G.C. 1978. Use of 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid as an auxin source in plant tissue cultures. *Crop Sci.* 18, 286-288.
- Corbiere, C., Liagre, B., Bianchi, A., Bordji, K., Dauca, M., Netter, P., Beneytout, J.L. 2003. Different contribution of apoptosis to the antiproliferative effects of diosgenin and other plant steroids, hecogenin and tigogenin, on human 1547 osteosarcoma cells. *Int. J. Oncol.* 22, 899-905.
- Coursey, D.G. 1967. Yams. An account of the nature, origins, cultivation and utilisation of the useful members of the Dioscoreaceae. Tropical Agriculture Series. London, Longmans. p. 230.
- Cronin, H., Draelos, Z.D. 2010. Top 10 botanical ingredients in 2010 anti-aging creams. *J. Cosmet. Dermat.* 9, 218–225.

- Dawson, R.F. 1991. Diosgenin production in North America: A brief history. *Hort. Technology*. 1, 22-27.
- Díaz, P.L.N. 2009. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. *RET*. 1, 32-55.
- Dinan, L. Harmatha, J., Lafont, R. 2001. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *J. Chromatogr. A*. 935, 105-123.
- Dodds, J.H., Roberts, L.W. 1990. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.S.A. 54-69.
- Evans, L.T. 1993. *Crop evolution, adaptation and yield*. Cambridge University Press. Cambridge, Great Britain. p. 514.
- FAO. 1995. Contenido de nutrientes en alimentos seleccionados. Disponible en <http://www.fao.org/DOCREP/006/W0073S/w0073s1x.htm>. Consultado el 18 agosto del 2012.
- FAOSTAT. 2012. FAO Statistical Database. Disponible en <http://faostat.fao.org/desktopdefault.aspx?pageID=567&lang=es#ancor>. Consultado el 17 agosto del 2012.
- Franco, T.L., Hidalgo, R. (eds.) 2003. Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. p. 89.
- Ganzler, K., Salgó, A., Valkó, K. 1986. Microwave extraction: A novel sample preparation method for chromatography. *J. Chromatogr.* 371, 299-306.
- Ganzler, K., Szinai, I., Salgó, A. 1990. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. *J. Chromatogr.* 520, 257-262.

- Gómez, A.L. 2011. Producción *in vitro* de callos en *Dioscorea* spp. modificando los componentes del medio de cultivo. Tesis de Licenciatura de Ingeniero Agrónomo. División de Ciencias Agronómicas. Universidad de Guadalajara. p. 41.
- Gómez, P., Ortuño, A., Del Río, J.A. 2004. Ultrastructural changes and diosgenin content in cell suspensions of *Trigonella foenum-graecum* L. by ethylene treatment. *Plant Growth Reg.* 44, 93–99.
- Guízar, M.A. Montañéz, S.J.L., García, R.I. 2008. Parcial caracterización de nuevos almidones obtenidos del tubérculo de camote del cerro (*Dioscorea* spp). *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha.* 9, 81-88.
- Hahn, S.K. 1995. Yams: *Dioscorea* spp. (Dioscoreaceae). In: Evolution of crop plants. Eds. Smartt J, Simmonds N.W. Longman Scientific and Technical. pp. 112-120.
- Hang, Y.Y., Xia, B., Zhou, Y.F., Wu, B.C., Peng, F. 2004. Study on diosgenin content of *Dioscorea zingiberensis* in Wudang Mountain areas related to biological characteristics. *Chemistry and Industry of Forest Products.* 23, 68-72.
- Harlan, R.J. 1992. Crops and man. American Society of Agronomy/Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin. p. 282.
- Hata, Y., Reguero, M.T., Arteaga de García, L., Buitrago, G., Álvarez, A. 2003. Evaluación del contenido de sapogeninas en variedades nativas de ñame (*Dioscorea* spp), provenientes de la colección de la Universidad de Córdoba. *Rev. Col. Quím. Farm.* 32, 149-157.
- Heftman E. 1976. Chromatography of steroids. *Journal Chromatography Library.* Vol.8. Ed. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam, The Netherlands. pp. 13-25.
- Heping, H., Shanlin, G., Lanlan, C., Xiaoke, J. 2008. *In vitro* induction and identification of autotetraploids of *Dioscorea zingiberensis*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 4, 448-455.

- Hernández, S.R., Lugo, C.E.C., Díaz, L., Villanueva, S. 2005. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. e-Gnosis. 3, 1-9.
- Hostettmann K., Hostettmann M., Marston A. 1986. Preparative chromatography techniques: Application in natural product isolation. Edited by Springer-Verlag. Berlín. pp. 15-121.
- Huai, Z.P., Ding, Z.Z., He, S.A., Li, H.Y., Ping, Z.Z. 1989. Research on correlation between climatic factors and diosgenin content in *Dioscorea zingiberensis* Wright. Acta Pharmac. Sin. 24, 702-706.
- Huang, C.C., Chiang, P.Y., Chen, Y.Y. Wang, C.C.R. 2007. Chemical composition and enzyme activity changes occurring in yam (*Dioscorea alata*) tubers during growth. Food Sci. Technol. 40, 1498-1506.
- IITA. 2012. Yam crop. Disponible en <http://www.iita.org/yam>. Consultado 23 julio del 2012.
- Kadota, H.; Niimi, Y. 2004 Improvement of micropropagation of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. Sci. Hort. 102, 461-466.
- Kaufmann, B., Rudaz, S., Cherkaoui, S., Veuthey, J.-L., Christen, P. 2007. Influence of plant matrix on microwave-assisted extraction process. The case of diosgenin extracted from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Phytochem. Anal. 18, 70-76.
- Lebot, V. 2009. Tropical root and tuber crops: cassava, sweet potato, yams and aroids. In: Crop production science in horticulture, 17. CABI Publishing, Wallingford, Oxon, GBR. pp. 413.
- Lebot, V., Malapa, R., Molisale, T., Marchand, J.L. 2006. Physo-chemical characterisation of yam (*Dioscorea alata* L.) from tubers from Vanuatu. Genet. Resour. Crop Ev. 53, 1199-1208.

- Lee, S. T., Mitchell, R. B., Wang, Z., Heiss, C., Gardner, D.R., Azadi, P. 2009. Isolation, characterization, and quantification of steroidal saponins in switchgrass (*Panicum virgatum* L.). J. Agric. Food Chem. 57, 2599-2604.
- León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. 2a. ed. rev. y aum. San José, Costa Rica: IICA. p. 445.
- Lin, J.T., Shih-Chuan Liu, Su-Lin Chen, Hsin-Yi Chen, Deng-Jye Yang 2006. Effects of domestic processing on steroidal saponins in taiwanese yam cultivar (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). J. Agric. Food Chem. 54, 9948-9954.
- Lin, J.T. Yang, D.J. 2008. Determination of steroidal saponins in different organs of yam (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). Food Chem. 108, 1068-1074.
- Liu, W., Huang, W., Sun, W., Zhu, Y., Ni, J. 2009. Production of diosgenin from yellow ginger (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) saponins by commercial cellulose. World J. Microbiol. Biotechnol. 26, 1171-1180.
- Lorey S., Porzel A., Ripperger, H. 1996. Steroid alkaloid glycosides from *Solanum coccineum*. Phytochem. 41, 1633-1635.
- Luck de Ugaz, O. 1988. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Editorial de la Pontificia Universidad Católica. pp 1, 9, 63.
- Mc Vaugh, R. 1989. Bromeliaceae to Dioscoreaceae. Flora Novo-Galiciana. The University of Michigan Herbarium. 15, 355-388.
- Marker, E.R., Tsukamoto, T., Turner, D.L. 1940. Sterols. C. Diosgenin. J. Am. Chem. Soc. 62, 2525-2532.
- Makunga, N.P., van Staden, J. 2008. An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. Plant. Cell Tiss. Organ Cult. 92, 63-72.
- Martin, F.W. 1969. The species of *Dioscorea* containing sapogenin. Econ. Bot.. 23, 373-379.

- Mendoza, M.G., Kaeppler, H.F. 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 38, 39-45.
- Mignouna, H.D., Dansi, A. 2003. Yam (*Dioscorea* spp.) domestication by the Nago and Fon ethnic groups in Benin. *Genet. Resour. Crop Evol.* 50, 519–528.
- Mignouna, H.D., Abang, M.M., Asiedu, R. 2007. 15 Yams. *In Pulses, Sugar and Tuber Crops.* Chittaranjan Kole, Ed. *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants.* 3, 271-296.
- Mineo, L. 1990. Plant tissue culture techniques. *In Tested studies for laboratory teaching.* Volume 11. C. A. Goldman, Editor. *Proceedings of the Eleventh Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE).* p. 195.
- Mishra, S.P., Gaikar, V.G. 2004. Recovery of diosgenin from *Dioscorea* rhizomes using aqueous hydrotropic solutions of sodium cumene sulfonate. *Ind. Eng. Chem. Res.* 43, 5339-5346.
- Molina, M.J.C y Córdova, T.L. (eds.). 2006. Recursos Fitogenéticos de México para la alimentación y la agricultura: Informe Nacional 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. p. 172.
- Montaldo, A. 1983. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José. Costa Rica. p. 284.
- Mostul, B., Cházaro, B.M. 1996. Camote de cerro: an edible caudiciform *Dioscorea* from México. *Cact. Succ. J.* 68, 6-8.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Muzac-Tucker, I., Asemota, H.N., Ahmad, M.H. 1993. Biochemical composition and storage of Jamaican yams (*Dioscorea* spp.). *J. Sci. Food Agric.* 62, 219-224.

- Mwirigi, P.N, Kahangi, E.M., Nyende, A.B., Mamati, E.G. 2009. Morphological variability within the Kenyan yam (*Dioscorea* spp.). J. Appl. Biosci. 16, 894-901.
- Nagaia, T., Suzukib, N., Nagashimaa, T. 2006. Antioxidative activity of water extracts from the yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) tuber mucilage *tororo*. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 108, 526–531.
- Narula, A., Kumar, S., Srivastava, P.S. 2005. Abiotic metal stress enhances diosgenin yield in *Dioscorea bulbifera* L. cultures. Plant Cell. Rep. 24, 250-254.
- Niño, J., Jiménez, D.A., Mosquera, O.M., Correa, Y.M. 2007. Diosgenin quantification by HPLC in a *Dioscorea polygonoides* tuber collection from Colombian flora. J. Braz. Chem. Soc. 5, 1073-1076.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-083-1986. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 14 de julio de 1986.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-607-NORMEX-2002. Alimentos. Determinación de cenizas en alimentos-Método de prueba. Declaratoria de Vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 3 de mayo de 2002.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-608-NORMEX-2002. Alimentos. Determinación de proteínas en alimentos-Método de prueba. Declaratoria de Vigencia en el Diario Oficial de la Federación el 3 de mayo de 2002.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-613-NORMEX-2003. Alimentos. Determinación de fibra cruda en alimentos-Métodos de Prueba. Declaratoria de Vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 19 de agosto de 2003.
- Norma Oficial Mexicana NMX-F-615-NORMEX-2004. Alimentos-Determinación de Extracto Etéreo (Método Soxhlet) en alimentos-Métodos de Prueba. Declaratoria de Vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de mayo de 2004.
- Norma Oficial Mexicana NOM-004-RECNAT-1996. Norma Oficial Mexicana, que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para realizar el

aprovechamiento, transporte y almacenamiento de raíces y rizomas de vegetación forestal. Declaratoria de Vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 24 de junio de 1996.

- Oakenfull, D. 1981. Saponins in food-A review. *Food Chem.* 7, 19-40.
- Opara, L.U. 2003. Yams: Post-harvest operation. AGST/FAO: Danilo Mejía, PhD, FAO (Technical). pp. 1-22.
- Opute, F.I., Osagie, A.U. 1978. Fatty acid composition of total lipids from some tropical storage organs. *J. Sci. Food Agric.* 29, 959-962.
- Orestes G.J., Meneses, A., Simonet, A.M., Macías, F.A., Nogueiras, C., Gómez, A., Escario, J.A. 2008. Saponinas esteroidales de la planta *Agave brittoniana* (Agavaceae) con actividad contra el parásito *Trichomona vaginalis*. *Rev. Biol. Trop.* 56, 1645-1652.
- Osunde, Z.D. 2008. Minimizing Postharvest Losses in Yam (*Dioscorea* spp): Treatments and Techniques. Chapter 12 from *Using Food Science and Technology to Improve Nutrition and Promote National Development*, Robertson, G.L. & Lupien, J.R. (Eds), International Union of Food Science & Technology. pp. 1-12.
- Pengelly, A., Bennett, K. 2011. Appalachian plant monographs: *Dioscorea villosa* L., wild yam. Disponible en <http://www.frostburg.edu/aces/appalachian-plants/>. Consultado 28 de abril del 2012.
- Perea, M., Buitrago, G. 2000. Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo del ñame. En: *Ñame: Producción de semillas por biotecnología*. Ed.: M. Guzmán y G. Buitrago. Universidad Nacional de Colombia. Editorial Uniblos. Bogotá, D.C. pp. 17-32.
- Pérez, A.N., Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal.* 11, 195-211.
- Poot-Matu, J.E., Mijangos, C.M.A. 2000. Serie Técnica de raíces y tubérculos N° 3, 5 y 6. Tabasco, México. p. 16.

- Qi, S.S., Dong, Y.S., Zhao, Y.K., Xiu, Z.L. 2009. Qualitative and quantitative analysis of microbial transformation of steroidal saponins in *Dioscorea zingiberensis*. *Chromatographia*. 69, 865-870.
- Raju, J., Rao, C.V. 2012. Diosgenin, a steroid saponin constituent of yams and fenugreek: Emerging evidence for applications in medicine. En: *Bioactive compounds in phytomedicine*. Prof. Iraj Rasooli (Ed.). pp. 125-142.
- Raju, J., Mehta, R. 2009. Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin. *Nutr.Cancer*.61, 27-35.
- Ramírez, R.R., Téllez, V.O. 1992. Las Dioscóreas (Dioscoreaceae) del estado de Morelos, México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México, Ser. Bot.* 63, 67-99.
- Ramos, E.F., Muñoz, A.M., Alvarado, O.U.C., Yáñez, J.A. 2010. Antocianinas, polifenoles, actividad anti-oxidante de sachapapa morada (*Dioscorea trifida* L.) y evaluación de lipoperoxidación en suero humano. *Rev. Soc. Quím. Perú.* 76, 61-72.
- Rochfort, S., Panozzo, J. 2007. Phytochemicals for health, the role of pulses. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7981–7994.
- Rodríguez, W. 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*. 11, 133-152.
- Rojas, R., Alba, J., Magaña-Plaza, I., Cruz, F., Ramos-Valdivia, A.C. 1999. Stimulated production of diosgenin in *Dioscorea galeottiana* cell suspension cultures by abiotic and biotic factors. *Biotechnol Lett.* 21, 907–911.
- Rokem, J.S., Tal, B., Goldberg, I. 1985. Methods for increasing diosgenin production by *Dioscorea* cells in suspension cultures. *J. Nat. Prod.* 48, 210-222.
- Royero, M., Vargas, M.T., Oropeza, M. 2007. Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (ñame). *Interciencia.* 32, 247-252.

- Sautour, M., Mitaine, O.A.C., Lacaille, D.M.A. 2007. The *Dioscorea* genus: a review of bioactive steroid saponins. *J. Nat. Med.* 61, 91-101.
- Scott, G.J., Rosegrant, M.W., Ringler, C. 2000. Raíces y Tubérculos para el Siglo 21. Tendencias, Proyecciones y Opciones de Política. IFPRI y CIAP. pp 1-64.
- Shajeela, P.S., Mohan, V.R., Jesudas, L.L., Soris, P.T. 2011. Nutritional and antinutritional evaluation of wild yam. *Trop. Subtrop. Agroecos.* 14, 723-730.
- Shanthakumari, S., Mohan, V.R., John de Britto. 2008. Nutritional evaluation and elimination of toxic principles in wild yam (*Dioscorea* spp.). *Trop. Subtrop. Agroecos.* 8, 319-325.
- Sharapin, N. 2000. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Santafé de Bogota D.C., Colombia. Roberto Pinzón. pp. 91-99.
- Shoh, A. 1988. Industrial applications of ultrasound. En: Suslick, Kenneth S. *Ultrasound: Its chemical, physical and biological effects.* New York, VCH Publishers. pp. 97-122.
- Shrum, J.E., Soderholm, P.K., Haun, J.R. 1958. Preliminary studies of *Dioscorea* growth in Florida. *Florida State Hort. Soc.* 71, 315-317.
- Sripaoraya, S., Marchant, R., Power, J.B., Davey, M.R. 2003. Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 39,450-454.
- Steinmacher, D.A., Cangahuala-Inocente, G.C., Clement, C.R., Guerra, M.P. 2007. Somatic embryogenesis from peach palm zygotic embryos. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 43, 124-132.
- Taylor, W.G., Zaman, M.S., Mir, Z., Mir, P.S., Acharya, S.N., Mears, G.J., Elder, J.L. 1997. Analysis of steroidal saponinins from Amber fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) by capillary gas chromatography and combined gas chromatography/mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 753-759.

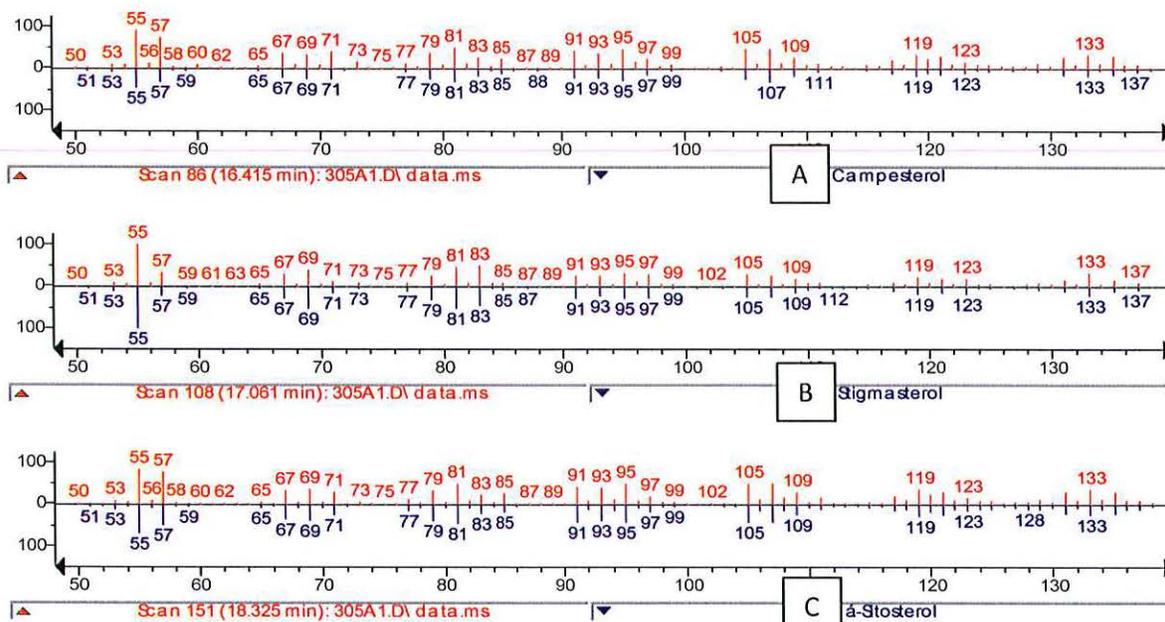
- Taylor, W.G., Elder, J.L., Chang, P.R., Richards, K.W. 2000. Microdetermination of diosgenin from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5206-5210.
- Taylor, W.G., Zulyniak, H.J., Richards, K.W., Acharya, S.N., Bittman, S., Elder, J.L. 2002. Variation in diosgenin levels among 10 accessions of fenugreek seeds produced in western Canada. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5994-5997.
- Téllez, V.O. 1996. Dioscoreaceae. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 9. Instituto de Biología, UNAM. pp. 5-13.
- Téllez V.O. 2009. Base de datos de las Fabaceae y Caesalpiniaceae (Sensu Cronquist) y Dioscoreaceae de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Informe final SNIB-CONABIO proyecto DS001. México, D.F.
- Tostado, M.M.C. 2012. Extracción y cuantificación de diosgenina a partir de camote de cerro (*Dioscorea spp*). Tesis de licenciatura en Ingeniería Química. División de Ingenierías. Universidad de Guadalajara. p. 65.
- Trouillas, P., Corbiere, C., Liagre, B., Duroux, J.L., Beneytout, J.L. 2005. Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. *Bioorg. Med. Chem.* 13, 1141-1149.
- Tschesche, R. 1972. Biosynthesis of cardenolides, bufadienolides and steroid saponinins. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 180, 187-202.
- USDA, 2007. A plants profile for *Dioscorea* (yam) from the USDA plants database. Disponible en <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=DIOSC> Consultado el 5 de diciembre del 2011.
- Usubillaga A.N., Meccia G. 1987. Steroidal saponinins from *Solanum scorpoidesum*. *J. Nat. Prod.* 50, 636-641.

- Valencia, M., Durango, S., Pinillos, J.F., Mejía, C.A., Gallardo, C.C. 2011. Extracción de fracciones con actividad antioxidante en hojas de *Guadua angustifolia* Kunth. Rev. Cubana Plant. Med. 16, 364-373.
- Valenzuela, B.A., Ronco, M.A.M. 2004. Fitoesteroles y fitoestanoles: Aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular. Rev. Chil. Nutr. 21, 161-169.
- Vázquez, T. M. 2004. Algunos personajes destacados y los nombres de las plantas. Revista de Divulgación Científica Tecnológica de la Universidad Veracruzana. 17, 21-26.
- Vendí, O., Wawrosch., C., Noe, C., Molina, C., Kahl, G., Kopp., B. 2006. Diosgenin contents and DNA fingerprint screening of various Yam (*Dioscorea* sp.) genotypes. Z. Naturforsch C. 61, 847-55.
- Villa, L.A.M., Orozco, A. I. 2003. Obtención de oleorresinas de azafrán de bolita (*Ditaxis heterantha*) por ultrasonido acoplados a extracción con solventes. Disponible en http://www.smbb.com.mx/congresos%20smbb/puertovallarta03/TRABAJOS/AREA_VI/CARTEL/CVI-35.pdf Consultado el 6 de mayo del 2013.
- Vincken, J.P., Heng, L., Groot, A., Gruppen, H. 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochemistry. 68, 275-297.
- Waizel-Bucay, J. 2009. El uso tradicional de las especies del género *Dioscorea*. Revista de Fitoterapia. 9, 53-67.
- Wina, E., Muetzel, S., Becker, K. 2005. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant productions-a review. J. Agric. Food Chem. 53, 8093-8105.
- Xu, Y., Han, X., Dong, D., Xu, L., Qi, Y., Peng, J., Zhan, L. 2008. Efficient protocol for purification of diosgenin and two fatty acids from Rhizoma dioscorea by SFE coupled with high-speed counter-current chromatography and evaporative light scattering detection. J. Sep. Sci. 31, 3638-3646.

- Yang, D.J., Lu, T.J., Hwang, L.S. 2003. Isolation and identification of steroidal saponins in taiwanese yam cultivar (*Dioscorea pseudojaponica* Yamamoto). *J. Agric. Food Chem.* 51, 6438-6444.
- Ye, A., Oo, L., Ib, U., Mi, A. 2010. Fatty acid composition of *Dioscorea dumetorum* (Pax) varieties. *Afr. J. Food Agric. Nutr. Develop.* 10, 2956-2966.
- Zannou A., Agbicodo, E., Zoundjihékpon, J., Struik, P.C., Ahanchédé, A., Kossou, D.K., Sanni, A. 2009. Genetic variability in yam cultivars from the Guinea-Sudan zone of Benin assessed by random amplified polymorphic DNA. *Afr. J. Biotechnol.* 8, 026-036.
- Zhang, J., Meng, Z., Zhang, M., Ma, D., Xu, S., Kodama, H. 1999. Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenae* rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood. *Clin. Chim.Acta.* 289, 79-88.
- Zhu, Q., Wu, F., Ding, F., Ye, D., Chen, Y., Li, Y., Zhifan, Y. 2009. Agrobacterium-mediated transformation of *Dioscorea zingiberensis* Wright, an important pharmaceutical crop. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 96, 317–324.
- Zhu, Y.L., Huang, W., Ni, J.R., Liu, W., Li, H. 2010. Production of diosgenin from *Dioscorea zingiberensis* tubers through enzymatic saccharification and microbial transformation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1409-1416.

APÉNDICE

Apéndice 1



Espectros identificados con la base de datos espectral NIST05L A.01.00, del CG-EM como A) campesterol, B) stigmasterol c) β-sitosterol.

Apéndice A2

Análisis de varianza de los tratamientos para número de callos formados, teniendo como factores MS mayores, sacarosa, accesión y regulador de crecimiento.

Fuente de variación	G.L.	C. M.	Fc	Pr > F
MS mayores	3	2.02	0.93	0.4304
Sacarosa	2	2.73	1.25	0.2904
Accesión	1	4.91	2.24	0.1367
Regulador	1	1.43	0.66	0.4197
Error	123	2.18		

* = ($P \leq 0.05$) Significativo; ** = ($P \leq 0.01$) Altamente significativo

Apéndice A3

Análisis de varianza de los tratamientos para número de callos formados, teniendo como factores los reguladores de crecimiento KIN y AIA y nudo y entrenado como explantes.

Fuente de variación	G.L.	C. M.	Fc	Pb > F
KIN	3	0.013	0.64	0.5895
AIA	2	0.011	0.54	0.5872
Explante	1	18.148	857.15	0.0000**
Error	92	0.021		
Total	115			

* = (P ≤ 0.05) Significativo; ** = (P ≤ 0.01) Altamente significativo

Apéndice A4

Análisis de varianza de los tratamientos para calidad de callos, teniendo como factores los reguladores de crecimiento KIN y AIA y nudo y entrenado como explantes.

Fuente de variación	G.L.	C. M.	Fc	Pb > F
KIN	3	0.088	0.49	0.6921
AIA	2	0.199	1.09	0.3392
Explante	1	85.354	467.19	0.0000**
Error	92	0.182		
Total	115			

* = (P ≤ 0.05) Significativo; ** = (P ≤ 0.01) Altamente significativo

Apéndice A5

Análisis de varianza de los tratamientos para cantidad de callos (mm^2), teniendo como factores los reguladores de crecimiento AIA y Picloram.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	Fc	Pb > F
AIA	3	369.14	5.27	0.0015**
Picloram	3	500.61	7.14	0.0001**
Error	92	70.07		
Total	312			

* = ($P \leq 0.05$) Significativo; ** = ($P \leq 0.01$) Altamente significativo

Apéndice A6

Análisis de varianza de los tratamientos para número de callos, teniendo como factores los reguladores de crecimiento AIA y Picloram.

Fuente de variación	G.L.	C.M.	Fc	Pb > F
AIA	3	0.7199	1.16	0.3310
Picloram	3	12.9323	20.89	0.0000**
Error	63	0.6190		
Total	78			

* = ($P \leq 0.05$) Significativo; ** = ($P \leq 0.01$) Altamente significativo