



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Inducción de microtubérculos *in vitro* y eliminación de dormancia en *Dioscorea sparsiflora* Hemsley**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Maestra en Ciencias en  
Biosistemática y Manejo de  
Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta**

**Mariela Monserrat Espíritu  
Rodríguez**

**DIRECTOR**

**Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba**

**Zapopan, Jalisco**

**04 de octubre de 2018**



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

---

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Inducción de microtubérculos *in vitro* y eliminación de dormancia en *Dioscorea sparsiflora* Hemsley**

**Tesis**

**que para obtener el grado de**

**Maestra en Ciencias en  
Biosistemática y Manejo de  
Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta**

**Mariela Monserrat Espíritu  
Rodríguez**

**DIRECTOR**

**Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba**

**Zapopan, Jalisco**

**04 de octubre de 2018**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

## Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Inducción de microtubérculos *in vitro* y eliminación de  
dormancia en *Dioscorea sparsiflora* Hemsley.

Por

Mariela Monserrat Espiritu Rodríguez

Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de  
Recursos

Naturales y Agrícolas

Aprobado por:

Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba  
Director de Tesis e integrante del jurado

04/SEP-2018

Fecha

Dr. Liberato Portillo Martínez  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

04 sep 2018

Fecha

Dr. Lino de la Cruz Larios  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

04/09/2018

Fecha

Dr. José Juvencio Castañeda Nava  
Asesor del Comité Particular e integrante del jurado

04-09-2018

Fecha

Dra. Patricia Zarazúa Villaseñor  
Sinodal e integrante del jurado

04/09/2018

Fecha

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi director de Tesis el Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba por su apoyo, dedicación, disposición y paciencia para la realización y finalización en tiempo de este proyecto, y sobre todo por las valiosas enseñanzas y tiempo compartido.

Gracias al Dr. Liberato Portillo Martínez, Dr. Lino de la Cruz Larios, Dr. José Juvenio Castañeda Nava y a la Dra. Patricia Zarazúa Villaseñor, por ser partícipes fundamentales en este proyecto.

Gracias al M en C. José Pablo Torres Morán por su valiosa orientación para la realización de los análisis estadísticos.

A mi familia, en especial a mi abuelita María Isabel Espíritu por siempre creer en mí, por guiarme, aconsejarme, apoyarme y ser mi segunda madre; un agradecimiento especial también a mi tío Diego Aguilar por tantos momentos de risa y llanto, por su incondicional apoyo en todo momento y por ser un gran ejemplo a seguir, mi respeto, cariño y admiración para ambos.

Gracias Orlando Rubio por encontrar en ti un apoyo, por aprender uno del otro y crecer juntos, por motivarme a ser mejor persona y por el enorme cariño que me has brindado desde que llegaste a mi vida.

Gracias Diego Rodríguez Peraza, por brindarme tu amistad, consejos y confianza, gracias por siempre escucharme y por estar ahí para mí en todo momento. Eres el mejor amigo, primo y roomie que pude tener.

Mitzzy Hernández y Norma Guzmán, gracias por brindarme su amistad, cariño y por siempre tener una palabra de aliento. Aún en la distancia, siempre contarán conmigo.

Gracias a las personas con las que afortunadamente coincidí en estos dos años, en especial a mis compañeros de generación: Sara, Enrique Peña, Enrique Chavarín, Martín, Hosmer, Gerardo, Giovanni y Jaime por compartir conmigo risas y estrés, los quiero.

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo otorgado de beca durante los estudios de Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas, a Mariela Monserrat Espíritu Rodríguez (número de becario: 603031).

ÍNDICE	Pág.
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vi
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Características del género <i>Dioscorea</i> .....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Distribución geográfica de las dioscóreas .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Condiciones agroclimáticas.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. Producción mundial de tubérculos.....</b>	<b>5</b>
<b>2.5. Importancia y usos de las dioscóreas .....</b>	<b>6</b>
2.5.1. Importancia del camote de cerro .....	7
<b>2.6. Propagación tradicional del género <i>Dioscorea</i> .....</b>	<b>8</b>
<b>2.7. Cultivo <i>in vitro</i> del género <i>Dioscorea</i>.....</b>	<b>9</b>
2.7.1. Microtuberización de las dioscóreas .....	10
<b>2.8. Dormancia .....</b>	<b>11</b>
2.8.1. Fases de la dormancia en tubérculos .....	12
2.8.2. Factores que afectan la duración de la dormancia.....	12
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>14</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>4.1. Objetivo general.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2. Objetivos específicos .....</b>	<b>15</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>16</b>
<b>5.1. Lugar de trabajo .....</b>	<b>16</b>
<b>5.2. Multiplicación del material vegetal <i>in vitro</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>5.3. Experimentos para la inducción de microtubérculos <i>in vitro</i> .....</b>	<b>16</b>
5.3.1. Sacarosa y fotoperiodo en la obtención de microtubérculos de la accesión PA .	17

5.3.2. Paclobutrazol y cloruro de cloro colina (CCC) en la obtención de microtubérculos de la accesión 751 .....	17
5.3.3. Efecto del paclobutrazol en la obtención de microtubérculos de la accesión 121.....	18
5.3.4. Efecto de la poliamina espermina en la obtención de microtubérculos de la accesión 121 .....	18
<b>5.4. Eliminación de dormancia en tubérculos de <i>D. sparsiflora</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>5.5. Adaptación de plantas y/o inducción de minitubérculos <i>ex vitro</i> de <i>D. sparsiflora</i>.....</b>	<b>19</b>
<b>5.6. Análisis estadístico .....</b>	<b>21</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>6.1. Experimentos para la inducción de microtubérculos .....</b>	<b>22</b>
6.1.1. Sacarosa y fotoperiodo en la obtención de microtubérculos de la accesión PA .	22
6.1.2. Paclobutrazol y cloruro de cloro colina (CCC) en la obtención de microtubérculos de la accesión 751.....	27
6.1.3. Efecto del paclobutrazol en la obtención de microtubérculos de la accesión 121 ...	31
<b>6.2. Eliminación de dormancia en tubérculos de <i>D. sparsiflora</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>6.3. Adaptación de plantas y/o inducción de minitubérculos <i>ex vitro</i> de <i>D. sparsiflora</i>.....</b>	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
<b>8. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>39</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>47</b>

**RESUMEN**

Los tubérculos de *Dioscorea sparsiflora*, conocidos en el occidente de México como “camote de cerro”, son utilizados en el estado de Jalisco y estados vecinos como fuente de alimento, medicina alternativa y son una fuente de ingresos para personas de pequeñas comunidades. Estos tubérculos no se cultivan, sino que son extraídos directamente de su hábitat natural. El objetivo fue desarrollar un método para la inducción de microtubérculos *in vitro* de *Dioscorea sparsiflora*. Para esto, se realizaron cuatro experimentos en los que se probó el efecto del fotoperiodo de incubación, y la adición al medio de cultivo de: sacarosa, retardantes de crecimiento y poliaminas; sobre la microtuberización *in vitro* de las accesiones papa aérea (PA), 112, 121 y 751. También se realizó un experimento donde se probó el efecto del paclobutrazol y de 6-benciladenina (CyStar®) en la eliminación de dormancia de tubérculos de *D. sparsiflora*. Se indujo microtuberización en presencia de 60 y 90 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, así como con 10 y 12 h de fotoperiodo en la accesión PA. El paclobutrazol a una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> resultó favorable para la microtuberización de las accesiones 751 y 121, la microtuberización de esta última se vio favorecida además por la poliamina espermina en concentraciones de 10 y 15 mg L<sup>-1</sup>. Por otro lado, el paclobutrazol también favoreció la eliminación de dormancia en tubérculos de *D. sparsiflora* a una concentración de 10 mg L<sup>-1</sup>.

**ABSTRACT**

The *Dioscorea sparsiflora* tubers, better known in western Mexico as "camote de cerro", are used in Jalisco and surrounding states as alternative medicine and also they are a source of income for small communities' habitants. These tubers are not cultivated, they are just extracted from their natural habitat. The objective was to develop a method for the induction of *in vitro* microtubers of *D. sparsiflora*. Four experiments were performed testing the incubation photoperiod effect and the addition to the medium sucrose, growth retardants and polyamines, on the *in vitro* microtuberization of the accessions of *D. sparsiflora* air potato (PA), 112, 121, and 751. Also, an experiment was performed to assess the paclobutrazol and 6-benzyladenine (CyStar) in the tubers' dormancy elimination of *D. sparsiflora*. Microtuberization was induced in presence of 60 and 90 g L<sup>-1</sup> of sucrose along with 10 and 12 h photoperiod in the PA accession. Paclobutrazol at a concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> was favorable for the microtuberization of accessions 751 and 121, microtuberization of the latter was further favored by polyamine spermine at concentrations of 10 and 15 mg L<sup>-1</sup>. On the other side, the paclobutrazol also favored the *D. sparsiflora* tubers' dormancy elimination at a 10 mg L<sup>-1</sup> concentration.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas que producen raíces tuberosas y tubérculos como la papa (*Solanum tuberosum*), batata (*Ipomoea batatas*), ñame (*Dioscorea spp*) y yuca (*Manihot esculenta*) desde hace mucho tiempo son cultivos básicos para los humanos, debido a que contribuyen de forma sustancial al suministro de proteínas y micronutrientes, como la vitamina C, siendo esenciales en la alimentación de países en desarrollo (Andres *et al.*, 2017; Chandrasekara y Kumar, 2016).

En el caso de *Dioscorea*, estos cultivos almacenan almidón, lo que les adiciona valor al ser usados en la fermentación de alimentos, bebidas y alimentos para animales (Ray y Sivakumar, 2009), así como en la elaboración de harinas (Ahmed y Urooj, 2008). Además, el contenido de saponósidos y saponinas que se encuentran de manera abundante en los tubérculos de las dioscóreas, son utilizados industrialmente para la obtención de diosgenina, la cual se emplea como precursor de la semisíntesis de fármacos esteroidales (Waizel-Bucay, 2009). En el mundo se producen 65'937,599 t de tubérculos de *Dioscorea* en una superficie de 7'454,583 ha con un rendimiento de aproximadamente 9 t/ha (FAOSTAT, 2017).

En la Zona Occidente de México, se conoce como “camote de cerro” a los tubérculos de *Dioscorea sparsiflora*, que pertenece a la familia Dioscoreaceae, la cual es casi exclusiva de zonas tropicales, de hierbas trepadoras con un tallo rizomatoso subterráneo, con tendencia a mantenerse perenne; hojas opuestas en la base de los tallos y alternas arriba, con varios nervios principales y nervación secundaria reticulada (León, 1987).

Las plantas de *D. sparsiflora* son utilizadas en Jalisco y estados vecinos como alimento y por sus propiedades en la medicina alternativa, para tratar padecimientos como la menopausia; además, se ha encontrado que sus tubérculos poseen un alto contenido de proteína y fibra (Contreras-Pacheco, 2013). El camote de cerro se colecta de manera silvestre por personas conocidas como “camotereros”, con el fin de venderlo crudo o cocido, actividad que ha ido incrementando año con año, esto ha provocado una escasez y una lenta recuperación de la población debido a su continua explotación.

La microtuberización *in vitro* ha sido utilizada como una forma de propagación en varias especies de *Dioscorea* como *D. fordii* (Yan *et al.*, 2011), *D. opposita* (Li *et al.*, 2014)

y *D. cayenensis* (Ovono *et al.*, 2007), debido a que permite la obtención de microtubérculos que pueden servir como material de propagación (semillas “asexuales”), y una multiplicación rápida de éstos en grandes cantidades, en un espacio reducido, sanas y en cualquier época del año (Perea y Buitrago, 2000), sin embargo, no existe información sobre la inducción de microtubérculos en *D. sparsiflora*.

Evaluar la efectividad de la microtuberización *in vitro* en *D. sparsiflora* ayudaría a que en un futuro se pueda cultivar, en lugar de solo extraerlo de su hábitat natural, ayudando a contrarrestar los efectos de su explotación; por otro lado, sería una forma de conservar germoplasma, sentando así, una base para próximos estudios sobre genética, fisiología y bioquímica de esta especie.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Características del género *Dioscorea*

La familia Dioscoreaceae alberga seis géneros y cerca de 850 especies, siendo el género *Dioscorea* el mayor con alrededor de 600 especies (Coursey, 1976). Según Raemaekers (2001) su ubicación taxonómica es la siguiente:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Dioscoreales

Familia: Dioscoreaceae

Género: *Dioscorea*

Téllez (1996) describe las siguientes características botánicas:

- Rizomas o tubérculos: leñosos o carnosos, simples o agrupados, de corteza delgada, gruesa o suberosa.
- Tallos: dextrovolubles o levovolubles, alados o lisos, rollizos o angulados, armados o inermes, glabros o pubescentes; con tricomas simples, unicelulares, glandulares.
- Hojas: alternas, opuestas o verticiladas, simples o palmado-compuestas, pecíolos usualmente con pulvínulos distales o proximales, 3-15 nervadas, las secundarias usualmente reticuladas horizontalmente.
- Inflorescencias: axilares, las estaminadas en racimos o panículas y las pistiladas en espigas o racimos.

- Flores: unisexuales, actinomorfas, perianto funeliforme o campanulado; seis tépalos, en dos verticilos similares o diferenciados. Flores estaminadas usualmente con seis estambres, en dos verticilos, todos fértiles o los tres más internos abortados, filamentos libres o connatos, anteras introrsas, tecas coherentes; estaminodios presentes o ausentes. Flores pistiladas epíginas, estaminodios seis, tres o ausentes; estilos libres o en una columna, simple o ramificada.
- Frutos: capsular o samaroides, con dos cavidades abortadas, dehiscente o indehiscente, 1-3- alado, cortáceo o membranáceo.
- Semillas: aplanadas u esféricas, reticuladas, semi-lisas o verrugosas, aladas periférica o lateralmente o sin ala.

## 2.2. Distribución geográfica de las dioscóreas

Las dioscóreas alcanzaron una distribución mundial al final del Cretáceo y su evolución subsecuente ocurrió por separado en el Viejo y Nuevo Mundo (Bhattacharjee *et al.*, 2011). Rodríguez-Delgado (2000) menciona que existen secciones taxonómicas diferentes del género en los dos hemisferios, pero ninguna está representada en ambos, y que, la separación del ancestro asiático del africano ocurrió posteriormente, en el Mioceno. Estas plantas fueron domesticadas hace aproximadamente 10,000 años en África, siendo uno de los primeros cultivos en domesticarse (Perea, 2001; Evans, 1993).

Podemos encontrar 74 especies en México (Téllez, 2009), siendo 40 endémicas con algunos tubérculos comestibles (Téllez, 1996). Dichas especies se encuentran distribuidas en diferentes estados de la república desde Sinaloa a Chiapas en el Pacífico, de Tamaulipas a la Península de Yucatán en el Golfo de México y de Chihuahua hasta Puebla y Querétaro en el Centro del país. En el estado de Jalisco se encuentran presentes 29 especies del género *Dioscorea* (Ramírez-Delgado *et al.*, 2010), entre las que destacan *D. sparsiflora* y *D. remotiflora* por ser las más utilizadas para el consumo como alimento (Guízar *et al.*, 2008).

### 2.3. Condiciones agroclimáticas

Las dioscóreas crecen en diversos climas, principalmente bosque lluvioso tropical, monzón tropical y sabana tropical. Son originarias de regiones forestales por lo que, la capacidad para trepar es una adaptación para este ambiente. Los agricultores suelen utilizar tutores para mantener las plantas erguidas, sin embargo, existen especies que no necesitan dicho apoyo (Rodríguez-Delgadillo, 2000).

Estas plantas requieren de suelos fértiles, profundos, con textura franca y drenada. Su crecimiento también parece ser afectado por la duración del día, sin embargo, más de 12 h luz favorecen el crecimiento de tallos y hojas (Coursey, 1967).

Un desarrollo favorable de los tubérculos de *Dioscorea* se presenta bajo una temperatura de entre 25 y 30 °C y temperaturas inferiores a los 20 °C pueden retrasar el rebrote (Rodríguez-Delgadillo, 2000), se requiere de una precipitación anual de aproximadamente 1500 mm para un buen crecimiento y desarrollo de las dioscóreas (Montaldo, 1991).

### 2.4. Producción mundial de tubérculos

Según datos de la FAOSTAT, en el año 2016 se produjeron en el mundo 65'937,599 t de tubérculos de *Dioscorea* en una superficie de 7'454,583 ha con un rendimiento de aproximadamente 9 t/ha, siendo África el país más importante, con una producción de 63'938,210 t; en América Latina, destacan los países de Haití, Colombia y Brasil como los mayores productores. Durante años la producción mundial de tubérculos ha estado encabezada por la papa (*Solanum tuberosum*), batata (*Ipomoea batatas*), yuca (*Manihot esculenta*) y ñame o yam (*Dioscorea spp*), este último ocupando el segundo lugar como tubérculos comestibles (Opara, 2003).

## 2.5. Importancia y usos de las dioscóreas

El cultivo del ñame ha contribuido a satisfacer los requerimientos energéticos y nutricionales de una gran parte de las poblaciones en países en desarrollo (Perea, 2001; Tamiru *et al.*, 2008). Las dioscóreas tienen un gran valor nutricional debido a su alto contenido de minerales, como el calcio, el hierro, el fósforo y la vitamina C (Udensi *et al.*, 2008). Tienen una composición similar a la de la papa; sin embargo, el ñame tiene un contenido mayor de proteínas, lo cual le confiere una importancia mayor con respecto a otros tubérculos (González, 2012).

El ñame aporta a la dieta de más de 300 millones de personas, aproximadamente 200 calorías diarias (Balogun, 2009) y principalmente se consume en forma cocida, en sopas, guisados o frito (Mostul y Cházaro, 1996). Se ha utilizado en la fabricación de harinas, dulces y papillas para bebé (González, 2012).

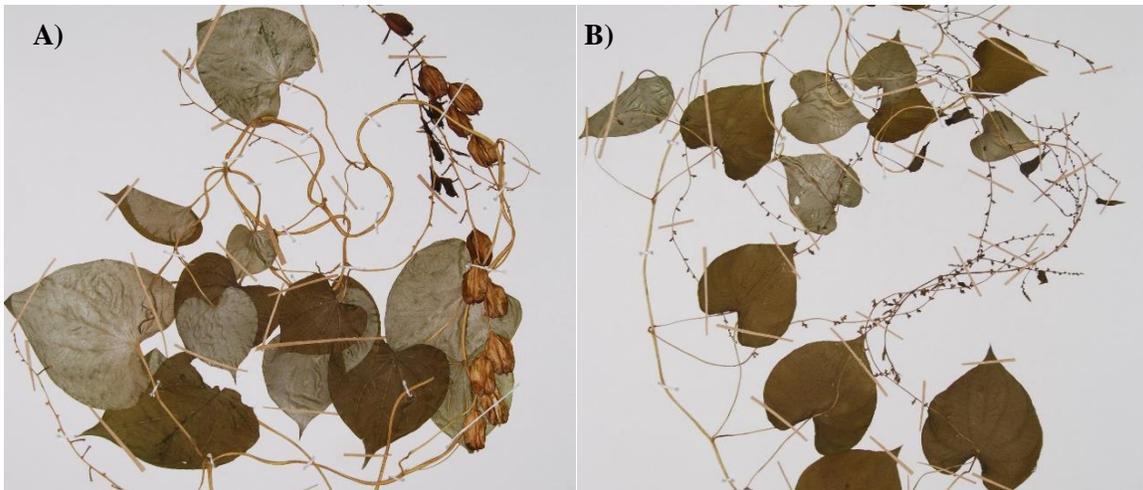
Los tubérculos de las dioscóreas contienen metabolitos secundarios con beneficios medicinales (Li *et al.*, 2010), estos metabolitos han sido utilizados en el tratamiento de enfermedades coronarias (Gong *et al.*, 2011) y gastritis (Pérez *et al.*, 2005). Además, se ha reportado que en la cáscara existen compuestos que tienen propiedades anticancerígenas y antimicóticas (Olayemi y Ajaiyeoba, 2007).

Algunas dioscóreas son utilizadas en la industria para la extracción de alcaloides y saponinas, particularmente las diosgeninas, utilizadas en la elaboración de fármacos esteroidales y recientemente se han utilizado en la extracción de compuestos para la obtención de bioplásticos (Bonilla y Hernández, 2012).

Debido a su alto valor nutrimental e importancia en la industria, su cultivo se ha considerado, junto al de la papa (*Solanum tuberosum*), como uno de los que más se producirán en los próximos años (Cabrera, 2009).

### 2.5.1. Importancia del camote de cerro

“Camote de cerro” es el nombre con el que comúnmente se les conoce a los tubérculos de *D. sparsiflora* Hemsley y *D. remotiflora* Kunth (figura 1). Estas plantas se encuentran principalmente en los estados de Jalisco y Michoacán, y sus tubérculos son recolectados por los llamados “camoteros” con la finalidad de consumirlos o venderlos, convirtiéndose en una importante fuente de ingresos (Jones *et al.*, 2011). Los camotes son vendidos cocidos o crudos a lo largo de las carreteras, en lugares donde los automovilistas deben disminuir la velocidad, como intersecciones de carreteras o cruce de ferrocarril; aunque también son muy populares en los mercados locales, teniendo diferentes precios según sea el caso (Mostul y Cházaro, 1996). En lo que respecta al contenido nutrimental, Contreras-Pacheco (2013) reportó mayores porcentajes de proteína cruda, humedad, cenizas, grasa, fibra cruda y carbohidratos en camote de cerro en comparación con las reportadas para varias especies de *Dioscorea* y menciona también que estos porcentajes son similares a los reportados en otros tubérculos como papa, batata y yuca.



**Figura 1.** *Dioscorea sparsiflora* Hemsley. A) Planta femenina y B) Planta masculina.

Además de su consumo como alimento, también son utilizados en la medicina alternativa para el tratamiento de los síntomas de la menopausia, ya que las personas que tienen este padecimiento mencionan que es muy efectivo para atenuar sus síntomas.

## **2.6. Propagación tradicional del género *Dioscorea***

Las dioscóreas son propagadas vegetativamente a través de tubérculo entero o secciones del mismo (Olivier *et al.*, 2012) o por bulbillos aéreos que se forman en la base de las hojas de plantas adultas (González, 2012).

Realizando la plantación de tubérculos, el desarrollo del tallo y el follaje se lleva a cabo a las dos semanas. El tubérculo se caracteriza por un crecimiento lento durante su iniciación, pero después de tres meses se agiliza. La mayor tasa de producción de fotosíntesis se logra después de los tres meses de emergencia de la planta y hay un gran almacenamiento de almidón, finalmente el proceso se vuelve lento nuevamente al final del desarrollo vegetativo de la planta (González, 2012).

La rapidez del rebrote del tubérculo dependerá de su edad fisiológica, debido a que los tubérculos pasan por un periodo de dormancia, tiempo durante el cual no rebrotan; sin embargo esta dormancia se pierde alrededor de los seis meses después de la cosecha (Coursey, 1967).

El principal problema de las especies que se propagan vegetativamente, como es el caso de las dioscóreas, es que este método de propagación es lento y poco prolífico, por lo que existe la necesidad de aplicar métodos rápidos de producción masiva (Bradshaw, 2010).

## 2.7. Cultivo *in vitro* del género *Dioscorea*

La propagación *in vitro* es un método que ayuda a estudiar, conservar y proteger muchas especies de importancia, además permite utilizar algunas ventajas biotecnológicas sobre el cultivo tradicional. Normalmente, las plantas absorben nutrientes del suelo. En el cultivo *in vitro*, las plantas absorben macro y micronutrientes, vitaminas, fuentes de carbono provisto en un medio de cultivo básico (sólido o líquido) (George *et al.*, 2008).

Para llevar a cabo de manera exitosa el cultivo *in vitro*, la selección de un medio de cultivo adecuado es de gran importancia, siendo el medio Murashige y Skoog (1962) el más utilizado (Bhojwani y Dantu, 2013). Por lo general, los medios de cultivo, son adicionados con diferentes suplementos, como la sacarosa que es aprovechada como fuente de carbono, y reguladores de crecimiento, los cuales son compuestos sintéticos obtenidos a partir de las hormonas vegetales que las plantas biosintetizan para controlar los procesos de aparición de raíces y yemas, dormancia, división celular, floración y maduración. Los reguladores de crecimiento, son utilizados en pequeñas cantidades; sin embargo, el tipo de regulador y la concentración depende de la planta y el tipo de tejido (El-Esawi, 2016).

El uso de las técnicas de cultivo *in vitro* en las dioscóreas permite principalmente la producción de plantas limpias, producción masiva de material vegetal en espacio reducido, conservación de las características genotípicas de un material o aumentar su variabilidad genética preexistente (Perea y Buitrago, 2000).

### 2.7.1. Microtuberización de las dioscóreas

En las plantas silvestres que desarrollan órganos de almacenamiento como tubérculos, cormos, rizomas o bulbos; el fomento de su cultivo ayudaría a facilitar el trasplante de plantas con una elevada tasa de supervivencia, así como un manejo adecuado de los órganos de almacenamiento para su uso como material de siembra (Bhojwani y Dantu, 2013).

La microtuberización consiste en la obtención de pequeños tubérculos en condiciones *in vitro* o *ex vitro* a partir de explantes nodales o apicales, empleando para su formación y crecimiento medios de cultivo y condiciones de incubación idóneas para la propagación (Ovono *et al.*, 2010a). La formación *in vitro* de órganos de almacenamiento se ha logrado en varias especies de *Dioscorea* a través del aumento de la concentración de sacarosa, variaciones en el fotoperiodo, temperatura y la adición de reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas, giberelinas y ácido jasmónico (Bhojwani y Dantu, 2013; Gong *et al.*, 2017).

Con el empleo de microtubérculos como material vegetal de plantación es posible lograr un progreso en la producción, pues se pueden plantar directamente en el campo y debido a que provienen de plantas limpias se evita la propagación de enfermedades, aunque su valor económico para la obtención de semillas está relacionado con el rendimiento y el tamaño de los microtubérculos (Dhital y Lim, 2012). Borges *et al.*, (2004) menciona que los microtubérculos se han convertido en el material vegetal de mayores perspectivas para el intercambio internacional de germoplasma.

## 2.8. Dormancia

En las plantas, la dormancia es la suspensión temporal del crecimiento visible de cualquier estructura vegetal que contenga un meristemo (Lang *et al.*, 1987).

Los tubérculos son órganos vegetativos que hibernan, y como muchos otros órganos similares (semillas, bulbos, yemas), presentan grados variables de dormancia (Okubo, 2000). Se pueden encontrar ejemplos de dormancia en todos los niveles de complejidad biológica. Los órganos inactivos suelen ser más resistentes a las tensiones bióticas y abióticas, como tal, la dormancia se considera un mecanismo de supervivencia (Suttle, 2004).

La dormancia es la etapa final de la vida de un tubérculo que sirve para preservarlos como órganos de reproducción vegetativa de crecimiento bajo condiciones desfavorables (Aksenova *et al.*, 2013). Cuando los tubérculos se encuentran en estado de dormancia, el crecimiento de brotes no ocurrirá, incluso si el tubérculo se encuentra en condiciones ideales para que esto ocurra (Struik y Wiersema, 1999).

Lang *et al.*, (1987) divide la dormancia en tres tipos:

- Endo-dormancia: el meristemo es detenido por factores fisiológicos que se originan dentro de la estructura afectada.
- Para-dormancia: el meristemo es detenido por factores fisiológicos externos.
- Ecto-dormancia: el meristemo es detenido debido a factores ambientales externos.

### **2.8.1. Fases de la dormancia en tubérculos**

Ile *et al.*, (2006) describe tres fases para la dormancia en tubérculos:

Fase I: iniciación de la aparición de meristemo de brotación del tubérculo. Esta fase comienza a partir de la aparición del tubérculo. La fase I de la dormancia se puede definir como el período durante el cual no se observa actividad meristemática activa, por lo tanto, se presenta una dormancia profunda o endodormancia.

Fase II: brotación de los meristemos del tubérculo al primordio foliar. La fase II comienza con la aparición del meristemo de brotación del tubérculo. Se presenta un cambio en el estado de la dormancia, de una endo-dormancia a una endo-/eco- dormancia. Esta fase termina con la aparición del primordio foliar.

Fase III: brotación del primordio foliar. Es el periodo que abarca desde el desarrollo del brote apical completo, hasta su eventual aparición en la superficie del tubérculo (como brote externo). Esta fase está influenciada por la temperatura y la humedad relativa.

### **2.8.2. Factores que afectan la duración de la dormancia**

Malagamba (1997) señala que los principales factores que afectan la duración del período de dormancia son los siguientes:

- La variedad. La dormancia del tubérculo puede durar menos de un mes o varios meses, según la variedad.
- Condiciones de crecimiento. Las condiciones en las cuales se producen los tubérculos semillas afectan la duración del período de dormancia. Por ejemplo, las temperaturas altas, el bajo contenido de humedad y la baja fertilidad de un suelo durante el crecimiento del tubérculo, aceleran el desarrollo fisiológico y la reducción en el período de dormancia.
- Temperatura de almacenamiento. Las temperaturas altas durante el almacenamiento aceleran el proceso de envejecimiento fisiológico del tubérculo y por consiguiente reducen el período de dormancia.
- Madurez del tubérculo. Los tubérculos inmaduros tienen usualmente un reposo más largo de poscosecha que los cosechados ya maduros.

- Tamaño del tubérculo. El tamaño es un factor que influye en la duración del período de dormancia. Los tubérculos pequeños tienen un período más prolongado que los más grandes. Además, los tubérculos pequeños presentan una pérdida de peso más acelerado, porque la superficie por unidad de peso es significativamente mayor. Este efecto de los tubérculos pequeños con relación a los más grandes, es independiente del ambiente de almacenamiento.

### 3. HIPÓTESIS

El aumento de la concentración de sacarosa, la adición de retardantes de crecimiento y poliaminas en el medio de cultivo así como la modificación de las condiciones de incubación inducirá la microtuberización *in vitro* de *D. sparsiflora*

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Desarrollar un método para la inducción de microtubérculos *in vitro* de *Dioscorea sparsiflora*.

### 4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de las concentraciones de sacarosa, la adición de retardantes de crecimiento y/o compuestos ancilares en el medio de cultivo para la obtención de microtubérculos de *D. sparsiflora*.
- Evaluar el efecto del fotoperiodo en la microtuberización *in vitro* de *D. sparsiflora*.
- Determinar el efecto del paclobutrazol en la eliminación de dormancia en tubérculos de *D. sparsiflora*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Lugar de trabajo

El trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), de la Universidad de Guadalajara, ubicada en Nextipac, Zapopan, Jalisco México a 20° 45' N y 103° 31' O, con una altitud de 1650 m.

### 5.2. Multiplicación del material vegetal *in vitro*

Se realizó la propagación *in vitro* de las accesiones 121, 751 y papa aérea (PA) de *Dioscorea sparsiflora* Hemsley, proporcionadas por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina ajustados a un pH 5.8 ± 0.5 y con 8 g L<sup>-1</sup> de agar como agente gelificante en frascos de vidrio con capacidad de 100 mL, cada uno con 25 mL de medio de cultivo. Las plántulas fueron propagadas cortando segmentos nodales con al menos dos yemas axilares de la planta madre y colocándolos en los frascos con el medio nuevo. Los frascos fueron incubados bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad con una intensidad lumínica de 2,000 lux (30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) y una temperatura de 27 ± 2 °C.

### 5.3. Experimentos para la inducción de microtubérculos *in vitro*

Se realizaron cuatro experimentos, en donde las variables a evaluar fueron la concentración de sacarosa, las condiciones de fotoperiodo, los retardantes de crecimiento paclobutrazol y cloruro de cloro colina y la concentración de la poliamina espermina, en las accesiones 121, 751 y PA.

Los medios de cultivo fueron ajustados a un pH 5.8 ± 0.5 y con 8 g L<sup>-1</sup> de agar como agente gelificante y se esterilizaron en autoclave a 121 °C y 1.3 kg/cm<sup>2</sup> de presión durante 15 min.

El establecimiento de los experimentos se llevó a cabo en una campana de flujo laminar, en donde se tomaron las plantas madre, previamente propagadas *in vitro*, y se separaron en segmentos nodales con dos yemas axilares, los cuales fueron colocados en frascos de vidrio de alimento infantil con capacidad de 100 mL, cada uno con 25 mL de medio de cultivo. Después de esto, los frascos fueron sellados y rotulados para ser llevados a incubación a una temperatura de  $27 \pm 2$  °C.

Las variables de respuesta consideradas para todos los experimentos fueron el número de microtubérculos por planta, así como el peso y diámetro de los microtubérculos obtenidos.

### **5.3.1. Sacarosa y fotoperiodo en la obtención de microtubérculos de la accesión PA**

El diseño experimental empleado fue un bifactorial 3x3 para la evaluación de tres concentraciones de sacarosa (30, 60 y 90 g L<sup>-1</sup>) y tres condiciones de fotoperiodo (8, 10 y 12 h de iluminación), con una intensidad lumínica de 2,000 lux. Teniendo como resultado nueve tratamientos con 18 repeticiones por accesión.

### **5.3.2. Paclobutrazol y cloruro de cloro colina (CCC) en la obtención de microtubérculos de la accesión 751**

El diseño experimental seleccionado para este experimento fue un bifactorial 4x4 con diez repeticiones por tratamiento. Las concentraciones de paclobutrazol utilizadas fueron 0, 0.1, 1 y 3 mg L<sup>-1</sup> en combinación con 0, 125, 250 y 500 mg L<sup>-1</sup> de CCC. Todos los tratamientos fueron adicionados con 6 % de sacarosa y se incubaron bajo un fotoperiodo de 12 h con una intensidad lumínica de 2,000 lux.

### **5.3.3. Efecto del paclobutrazol en la obtención de microtubérculos de la accesión 121**

Un diseño completamente al azar fue utilizado en este experimento para cada accesión, donde se probaron 0, 0.1, 1 y 3 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol, dando como resultado cuatro tratamientos con diez repeticiones, adicionados con 6 % de sacarosa e incubados bajo un fotoperiodo de 12 h con una intensidad lumínica de 2,000 lux.

### **5.3.4. Efecto de la poliamina espermina en la obtención de microtubérculos de la accesión 121**

Se diseñó un experimento completamente al azar evaluando cuatro concentraciones de la poliamina espermina (0, 10, 15 y 20 mg L<sup>-1</sup>). Cada tratamiento contó con diez repeticiones y fueron adicionados con 6 % de sacarosa e incubados bajo un fotoperiodo de 10 h con una intensidad lumínica de 2,000 lux.

### **5.4. Eliminación de dormancia en tubérculos de *D. sparsiflora***

Se llevó a cabo un experimento bifactorial 3x4 con 10 repeticiones por tratamiento, donde se comparó el efecto de tres concentraciones de paclobutrazol (0, 5 y 10 mg L<sup>-1</sup>) y cuatro de 6-benciladenina (0, 2, 4 y 8 mg L<sup>-1</sup>) en la eliminación de dormancia en segmentos de tubérculos obtenidos en campo de *D. sparsiflora*. Para el establecimiento del experimento se tomaron tubérculos de *D. sparsiflora*, se cortaron en trozos de 2 cm de largo que presentaban un diámetro aproximado de 2 cm y se colocaron en recipientes con capacidad de 300 mL. Dichos trozos fueron sumergidos durante 24 h en 100 mL de tratamiento y pasado este tiempo se llevaron a incubación a 28 °C, tomando como variables de respuesta la fecha de aparición de los brotes.

### 5.5. Adaptación de plantas y/o inducción de minitubérculos *ex vitro* de *D. sparsiflora*

Se conoce como minitubérculos a los pequeños tubérculos obtenidos en suelo bajo condiciones *ex vitro* a partir de plántulas obtenidas *in vitro* (Olivier *et al.*, 2012). Un ensayo preliminar fue desarrollado con 20 plantas de la accesión 751 enraizadas en medio MS adicionado con 1 y 3 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol y 20 plantas de la misma accesión enraizadas en medio MS con 2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina. Un mes después de haberse establecido *in vitro*, las plantas se rescataron de los frascos y se lavaron con agua corriente para quitar por completo el medio de cultivo de las raíces, después se les aplicó el enraizador ácido indol-3-butírico al 1.0 % (RADIX 10000<sup>®</sup>) y se colocaron en charolas de unicel de 60 cavidades con turba de musgo. Las charolas se llevaron a un invernadero con intensidad lumínica de 12500 lux, una humedad relativa del 90 % y una temperatura de 30 ± 5 °C y se colocaron debajo de una mesa la cual fue cubierta con plástico. Después de una semana, se retiró el plástico y las charolas se asperjaron cada tercer día con 1 g L<sup>-1</sup> de Captan Ultra<sup>®</sup> (carboxamida).

Posteriormente se realizó un experimento utilizando las accesiones 10, 112, 121, 751 y PA bajo las mismas condiciones que el ensayo preliminar (figura 2), esto con el fin de evaluar el porcentaje de supervivencia de las plantas, el número de minitubérculos por planta, así como el peso y diámetro de dichos minitubérculos.



**Figura 2.** Charolas colocadas en invernadero con 20 plantas de las accesiones 112, 121, 751 y PA enraizadas en medio MS adicionado con 1 y 3 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol.

## 5.6. Análisis estadístico

Los datos de las variables número de microtubérculos, peso y diámetro, fueron analizados con base a un análisis de varianza (ANVA) y en los casos en donde se detectaron diferencias significativas se realizó una comparación de medias con base en la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS).

En algunos ensayos al realizar la prueba de normalidad se observó que los datos no provenían de una distribución normal, por lo que se procedió a realizar una transformación, los datos de las variables peso y diámetro se ajustaron a una distribución normal mediante el logaritmo natural y se analizaron con base en el ANVA y la prueba DMS. Los datos de número de microtubérculos no presentaron una distribución normal, así que para su análisis se utilizó la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y en los casos en los que se detectaron diferencias significativas se realizó una comparación de medianas de Mood.

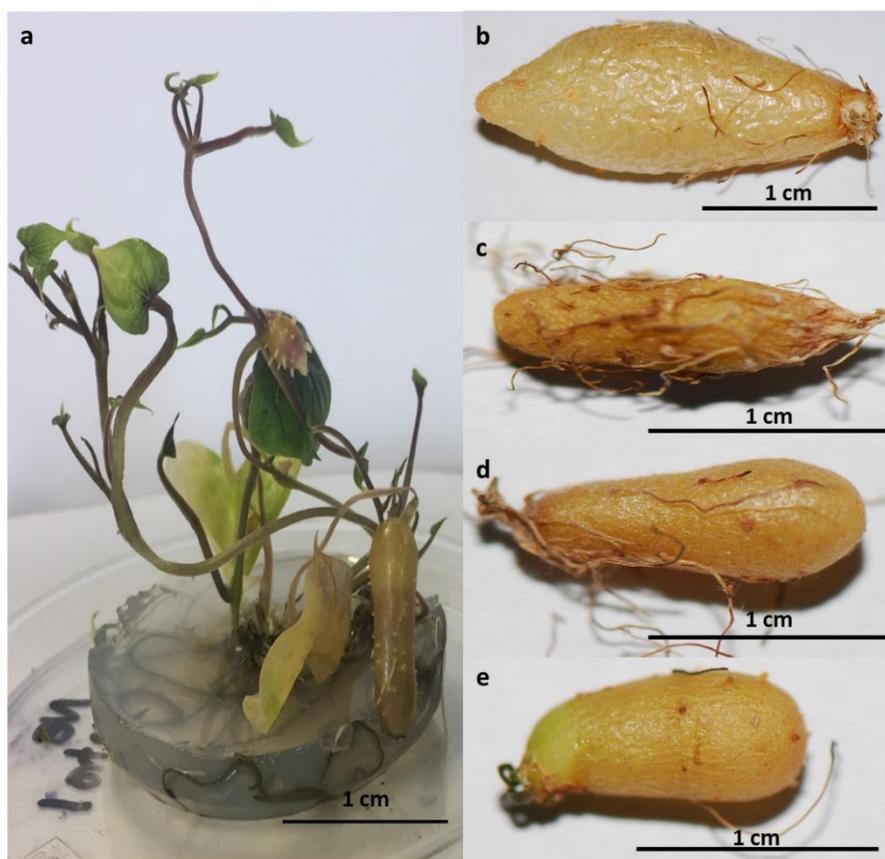
Finalmente, los datos de presencia/ausencia se analizaron con base en una regresión de Poisson.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Experimentos para la inducción de microtubérculos

#### 6.1.1. Sacarosa y fotoperiodo en la obtención de microtubérculos de la accesión PA

Los resultados del ANVA mostraron que existen diferencias altamente significativas en las condiciones de fotoperiodo ( $P = 0.000$ ) para la obtención de microtubérculos (figura 3a) a los 90 d de cultivo *in vitro* (ver anexo 1). Debido que los datos no se ajustaron a una distribución normal (ver anexo 2), se procedió a realizar el análisis con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis la cual coincidió en que existen diferencias altamente significativas ( $P = 0.000$ ) en las condiciones de fotoperiodo sobre el número de microtubérculos a los 90 d de cultivo *in vitro*. Por otro lado la prueba de medianas de Mood, la cual se basa en el número de casos mayores a la mediana, muestra que un fotoperiodo de 10 y 12 h resultaron eficaces en la inducción de microtubérculos *in vitro* (figura 3b) de la accesión PA a los 90 d (cuadro 1). Castañeda-Nava (2016) observó que un fotoperiodo de 8 h presentó los mejores promedios de tuberización en la accesión PA, sin embargo no se reporta su efecto en el peso y diámetro de los microtubérculos. Por otro lado, en *D. rotundata*, se ha observado que fotoperiodos de 12 y 16 h favorecen la microtuberización y fotoperiodos de 8 y 24 h la disminuyen (Ng, 1988). Lo anterior se debe a que los cambios en el fotoperiodo tienen un efecto muy marcado en el desarrollo y crecimiento de las especies de *Dioscorea*, que influyen en el desarrollo del tubérculo (Marcos *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Obtención de microtubérculos *in vitro*. a) Microtubérculos obtenidos *in vitro* de *D. sparsiflora*. b) Microtubérculo de la accesión PA propagada en 10 h de fotoperiodo y 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. c) Microtubérculo de la accesión 751 propagada en medio MS con 3 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol y 500 mg L<sup>-1</sup> de CCC. d) Microtubérculo de la accesión 121 propagada en medio MS con 1 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol. e) Microtubérculo de la accesión 121 en medio MS con 10 mg L<sup>-1</sup> de espermina.

**Cuadro 1.** Efecto del fotoperiodo sobre el número de microtubérculos de la accesión PA de *Dioscorea sparsiflora* a los 90 d de cultivo *in vitro*.

Fotoperiodo	n<=	n>	Mediana del No. de microtubérculos
<i>Valor-P</i>			<b>0.000**</b>
8	46	2	0a‡
10	38	14	1 b
12	36	15	1 b

\*\* Altamente significativo ( $P < 0.01$ )

Gran mediana = 1.0

n<= Número de eventos menores a la gran mediana

n> Número de eventos mayores a la gran mediana

‡ Datos con diferente letra son estadísticamente distintas ( $P < 0.05$ ) con base en la Prueba de la Mediana de Mood

El análisis de varianza realizado señaló la existencia de diferencias significativas ( $P = 0.013$ ) entre las concentraciones de sacarosa para la obtención de número de microtubérculos *in vitro* de la accesión PA a los 90 d (ver anexo 1). Debido a que los datos no pudieron ajustarse a una distribución normal (ver anexo 2) éstos se analizaron con base en la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, esta coincidió en que existe una diferencia significativa ( $P = 0.018$ ) entre las concentraciones de sacarosa. Concentraciones de 60 y 90 g L<sup>-1</sup> resultaron eficientes para la obtención de microtubérculos de la accesión PA a los 90 d (figura 3b), mientras que una concentración de 30 g L<sup>-1</sup> condujo a una reducción en el número de microtubérculos (cuadro 2). Altas concentraciones de sacarosa resultan ser eficaces en la obtención de microtubérculos, debido a que esta se convierte en almidón durante el desarrollo de los microtubérculos, el almidón es acumulado, lo que genera a la vez un aumento en el peso y el diámetro (Al-Hussaini *et al.*, 2015).

**Cuadro 2.** Efecto de la concentración de sacarosa sobre el número de microtubérculos de la accesión PA de *D. sparsiflora* a los 90 d de cultivo *in vitro*.

Sacarosa	n<=	n>	Mediana del No. de microtubérculos
<i>Valor-P</i>			<b>0.018*</b>
30 g L <sup>-1</sup>	45	5	1.0a
90 g L <sup>-1</sup>	40	10	1.0ab
60 g L <sup>-1</sup>	35	16	1.0 b

\* Estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ )

Gran mediana = 1.0

n<= Número de eventos menores a la gran mediana

n> Número de eventos mayores a la gran mediana

En el caso de la variable peso, los datos se ajustaron a una distribución normal al utilizar el logaritmo natural, por lo que se analizaron mediante un ANVA y posteriormente a los resultados de este análisis se les aplicó la inversa, por lo que los resultados que se presentan a continuación son los valores reales; los cuales mostraron alta significancia para fotoperiodo ( $P = 0.000$ ) y concentración de sacarosa ( $P = 0.000$ ), sin embargo también la interacción entre estos dos factores resultaron altamente significativos ( $P = 0.000$ ). Debido a esta interacción se realizó un ANVA simple de los nueve tratamientos, dicho análisis arrojó que existe una diferencia altamente significativa ( $P = 0.000$ ) entre los nueve tratamientos y la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) dio como resultado que los tratamientos que pertenecen al grupo con mayores pesos presentan promedios de 0.77 y 0.85 g (cuadro 3).

**Cuadro 3.** Comparación múltiple de medias para peso de microtubérculos de la accesión PA de *D. sparsiflora*.

	Sacarosa (g L <sup>-1</sup> )		
	30	60	90
Fotoperiodo (h)			
8	0.47 g±1.09a	0.57 g±1.08ab	0.76 g±1.07cd
10	0.67 g±1.09bc	0.85 g±1.05d	0.68 g±1.06bc
12	0.59 g±1.06b	0.77 g±1.05cd	0.79 g±1.06cd

Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) ( $P < 0.05$ ).

± Desviación estándar

Los datos de la variable diámetro también se pudieron ajustar a una distribución normal, por lo que se analizaron mediante un ANVA; el análisis mostró que existen diferencias altamente significativas ( $P = 0.000$ ) entre las concentraciones de sacarosa, al presentar mayores promedios con 60 y 90 mg L<sup>-1</sup> (cuadro 4). Cambios en la concentración de sacarosa, dependiendo de la especie, puede o no tener un efecto importante en la microtuberización (Ovono *et al.*, 2007). Uchendu *et al.*, (2016) reportan que concentraciones altas favorecen la tuberización, así como la obtención de microtubérculos con un mayor peso en *D. rotundata*. Además, Li *et al.*, (2014) encontraron que, concentraciones superiores a 60 g L<sup>-1</sup> inhibe la tasa de tuberización en *D. opposita*, y señalan esta concentración como óptima para la obtención de mejores parámetros de tuberización (número de microtubérculos, peso y diámetro). Observaciones similares se han reportado para papa, ya que altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo han resultado favorable en la inducción de microtubérculos y en el aumento del diámetro y el peso de éstos (Xu *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 2017).

**Cuadro 4.** Efecto de la concentración de sacarosa sobre el diámetro de los microtubérculos de la accesión PA de *D. sparsiflora*

Sacarosa (g L <sup>-1</sup> )	Diámetro (mm)
<i>Valor-P</i>	<b>0.000**</b>
30	2.02±1.08a‡
60	2.21±1.13 b
90	2.25±1.03 b

\*\* Altamente significativo ( $P < 0.01$ )

‡ Datos con diferente letra son estadísticamente distintas ( $P < 0.05$ ) con base en la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS)

± Desviación estándar

#### 6.1.2. Paclobutrazol y cloruro de cloro colina (CCC) en la obtención de microtubérculos de la accesión 751

La prueba de ANVA arrojó la existencia de diferencias altamente significativas ( $P = 0.000$ ) entre las concentraciones de paclobutrazol y significativas ( $P = 0.039$ ) entre las concentraciones de CCC en la obtención de microtubérculos de la accesión 751 a los 120 d de cultivo *in vitro* (ver anexo 3). Debido a que los datos no se ajustaron a una distribución normal (ver anexo 4) se realizó el análisis con base en la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis la cual mostró que existe una diferencia altamente significativa ( $P = 0.000$ ) entre las concentraciones de paclobutrazol y entre las concentraciones de CCC ( $P = 0.009$ ). Una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol resultó eficiente para la obtención de un mayor número de microtubérculos de la accesión 751 a los 120 d (cuadro 5).

**Cuadro 5.** Efecto de la concentración de paclobutrazol sobre el número de microtubérculos de la accesión 751 de *D. sparsiflora* a los 120 d de cultivo *in vitro*.

Paclobutrazol	n<=	n>	Mediana del No. de microtubérculos
<i>Valor-P</i>			<b>0.000**</b>
0.1 mg L <sup>-1</sup>	32	8	0a
0 mg L <sup>-1</sup>	34	6	0a
3 mg L <sup>-1</sup>	28	12	0a
1 mg L <sup>-1</sup>	13	27	2 b‡

\*\* Altamente significativo ( $P < 0.01$ )

Gran mediana = 0

n<= Número de eventos menores a la gran mediana

n> Número de eventos mayores a la gran mediana

‡ Datos con diferente letra son estadísticamente distintas ( $P < 0.05$ ) con base en la Prueba de la Mediana de Mood

Los retardantes de crecimiento también han resultado eficientes en la inducción de microtubérculos *in vitro* de varios genotipos de papa (Harvey *et al.*, 1991). Šimko (1994) reporta que, el paclobutrazol en concentraciones menores a 10 mg L<sup>-1</sup> acelera la formación de microtubérculos de papa (cv. Rema) y menciona que concentraciones mayores disminuyen el número de éstos. El autor señala que la inhibición de la biosíntesis de giberelina provocada por el paclobutrazol es lo que conduce a la aceleración de la microtuberización. El diámetro de los microtubérculos obtenidos también se vio influenciado por la concentración de paclobutrazol; los datos se ajustaron a una distribución normal mediante la utilización del logaritmo natural, permitiendo así su análisis mediante un ANVA, dicho análisis mostró que existen diferencias significativas ( $P = 0.011$ ) y la prueba DMS arrojó que una concentración de 3 mg L<sup>-1</sup> fue la que permitió la obtención de microtubérculos con mayor diámetro (cuadro 6) (figura 3c).

**Cuadro 6.** Efecto de la concentración de paclobutrazol sobre el diámetro de los microtubérculos de la accesión 751 de *D. sparsiflora* a los 120 d de cultivo *in vitro*.

Paclobutrazol	Diámetro (mm)
ANVA	<b>0.010*</b>
0.1 mg L <sup>-1</sup>	1.1±1.3a
1 mg L <sup>-1</sup>	1.1±1.4a
0 mg L <sup>-1</sup>	1.2±1.1ab
3 mg L <sup>-1</sup>	1.6±1.3 b

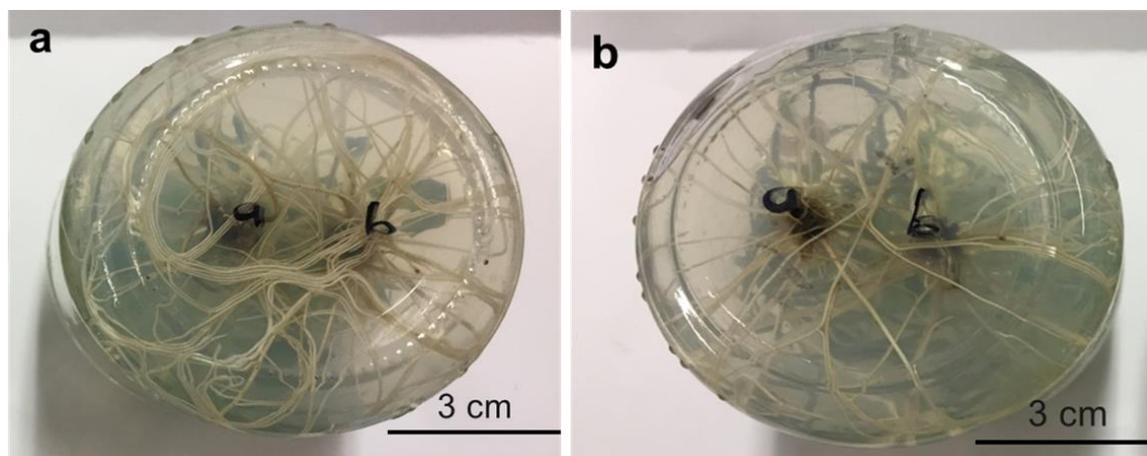
\* Estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ )

‡ Datos con diferente letra son estadísticamente distintas ( $P < 0.05$ ) con base en la Prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS)

± Desviación estándar

Concentraciones de 125 y 500 mg L<sup>-1</sup> de CCC fueron los mejores para la obtención de microtubérculos de la accesión 751 a los 120 d (figura 4). Zakaria *et al.*, (2008) mencionan que una concentración de 500 mg L<sup>-1</sup> redujo el tiempo de tuberización e incrementó el número de microtubérculos de papa, sin embargo en este estudio se encontró que tanto 500 como 250 mg L<sup>-1</sup> tienen un efecto estadísticamente similar en la microtuberización de *D. sparsiflora* (figura 3c).





**Figura 5.** Desarrollo de raíz vigorosa en plantas de la accesión 751 de *D. sparsiflora* a los 30 d de cultivo *in vitro*. **a)** Desarrollo de raíz en medio MS con 1 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol. **b)** Desarrollo de raíz en medio MS con 3 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol.

### 6.1.3. Efecto del paclobutrazol en la obtención de microtubérculos de la accesión 121

El análisis de varianza dio como resultado que existe una diferencia significativa ( $P = 0.010$ ) entre las concentraciones de paclobutrazol para la obtención de microtubérculos de la accesión 121 a los 120 d (ver anexo 5). Dado que los datos no fueron normales (ver anexo 6), el análisis se llevó a cabo con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis, esta coincidió en que existen diferencias significativas ( $P = 0.017$ ) entre las concentraciones de paclobutrazol para el número de microtubérculos. Un mayor número de microtubérculos se obtuvo con 1 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol (cuadro 7) (figura 3d). Harvey *et al.*, (1992) reportan que una concentración de 3 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol aumenta el porcentaje de tuberización en papa a las 8 semanas de incubación, los autores le atribuyen la inhibición de la iniciación de la formación de microtubérculos al aumento de los niveles endógenos de giberelinas.

**Cuadro 7.** Efecto de la concentración de paclobutrazol sobre el número de microtubérculos de la accesión 121 de *D. sparsiflora* a los 120 d de cultivo *in vitro*.

<b>Paclobutrazol</b>	<b>n&lt;=</b>	<b>n&gt;</b>	<b>Mediana</b>
<b>Valor-P</b>			<b>0.017*</b>
3 mg L <sup>-1</sup>	7	3	1a
0 mg L <sup>-1</sup>	8	2	1.5a
0.1 mg L <sup>-1</sup>	9	1	2.5a
1 mg L <sup>-1</sup>	3	7	5.5 b‡

\*Estadísticamente significativo ( $P < 0.05$ )

Gran mediana = 3

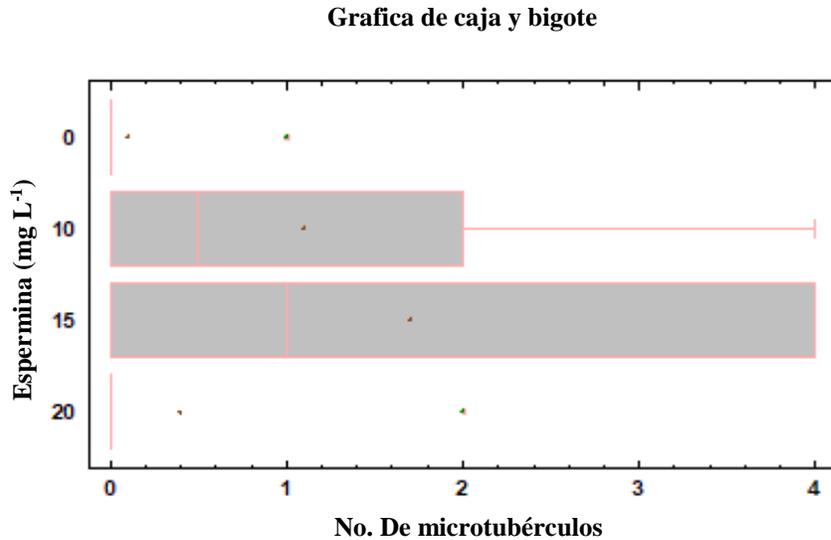
$n \leq$  Número de eventos menores a la gran mediana

$n >$  Número de eventos mayores a la gran mediana

‡ En las columnas, datos que presentan diferente letra son estadísticamente distintas ( $P < 0.05$ ) con base a la Prueba de la Mediana de Mood

#### **6.1.4. Efecto de la poliamina espermina en la obtención de microtubérculos de la accesión 121**

La prueba Kruskal Wallis mostró que existen diferencias significativas entre las concentraciones de espermina ( $P = 0.042$ ); se observó un mayor número de microtubérculos con 10 y 15 mg L<sup>-1</sup> (figura 3e) a los 120 d de cultivo *in vitro* de la accesión 121 de *D. sparsiflora* (figura 6), esto se debe a que las poliaminas putrescina, espermina y espermidina se consideran como reguladores de crecimiento vegetal puesto que participan en los procesos fisiológicos de las plantas (Podwyszyńska *et al.*, 2012).



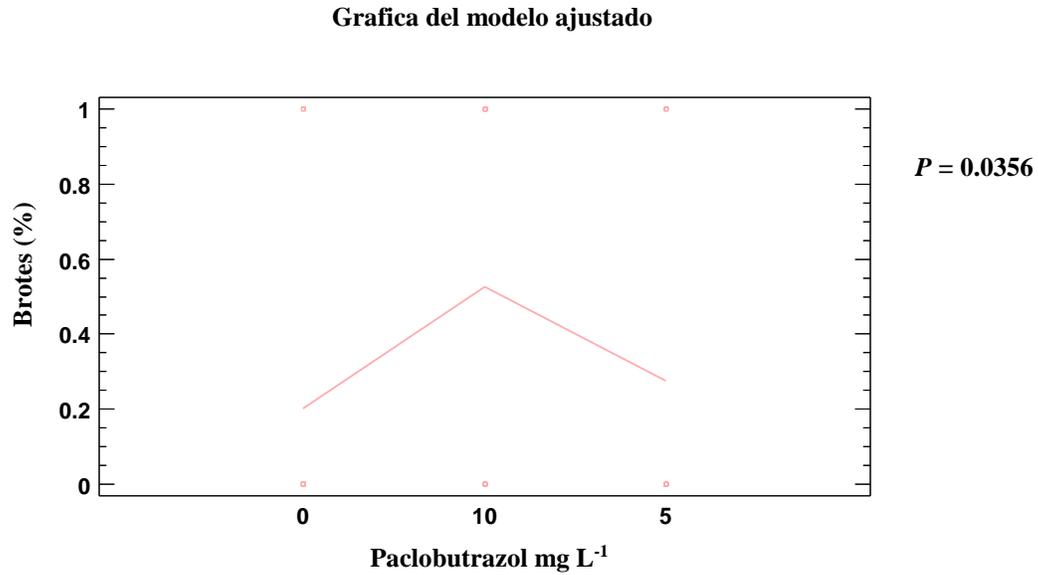
**Figura 6.** Gráfica del efecto de la concentración de la poliamina espermina sobre el número de microtubérculos de la accesión 121 a los 120 d de cultivo *in vitro*.

Ovono *et al.*, (2010b) mencionan que la utilización de poliaminas en el medio de cultivo favorece la formación de microtubérculos en el complejo *Dioscorea cayenensis*–*Dioscorea rotundata* y reporta que en presencia de 20 mg L<sup>-1</sup> de espermina la aparición de los microtubérculos se acelera, al mostrar de un 20 a un 50 % de las plantas con presencia de microtubérculos después de los 14 d, sin embargo, los autores manifiestan que la disminución en el tiempo de microtuberización no está directamente relacionada con las concentraciones de poliaminas ya que solo se relaciona con la inducción de microtubérculos.

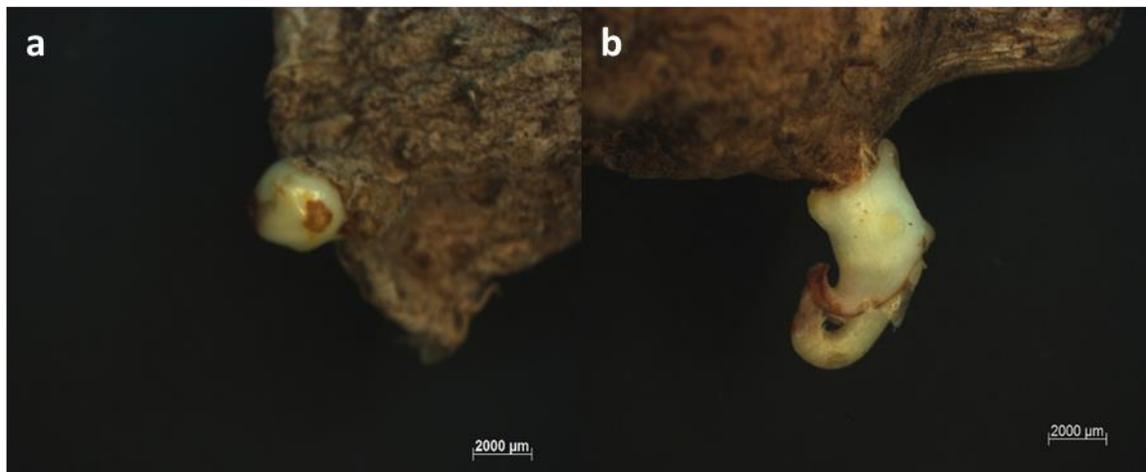
## 6.2. Eliminación de dormancia en tubérculos de *D. sparsiflora*

Debido a que la toma de datos se llevó a cabo tomando en cuenta la presencia o ausencia de brotes en trozos de tubérculos de *D. sparsiflora* en estado de dormancia, estos se analizaron con una regresión de Poisson, la cual arrojó que existe una relación estadísticamente significativa ( $P = 0.035$ ) entre la concentración de paclobutrazol y la incidencia de brotes.

Una concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de paclobutrazol permitió la brotación de tubérculos de *D. sparsiflora* a partir de los 30 d de incubación a  $28 \text{ °C}$  alcanzando más de un 50 % de los trozos con brotes a los 90 d (figura 7) mientras estos se encontraban en estado de dormancia (figura 8), sin embargo la citocinina 6-benciladenina no tuvo un efecto significativo sobre la brotación de los trozos de tubérculos de *D. sparsiflora*. Shiwachi *et al.*, (2003) mencionan que los retardantes de crecimiento uniconazol-P y prohexadione-calcium reducen el período de dormancia en tubérculos de *D. rotundata* y *D. alata* a partir de los 21 d debido a que tienen efecto inhibitorio en la biosíntesis de giberelinas en tubérculos de *Dioscorea*; contrario a esto, se ha observado que la aplicación exógena de giberelinas ayuda a la ruptura de la dormancia en tubérculos de papa a causa de que generan un ligero aumento en la concentración de glucosa (Alexopoulos *et al.*, 2007).



**Figura 7.** Gráfica del modelo ajustado para la incidencia de brotes de tubérculos de *D. sparsiflora* en estado de dormancia por paclobutrazol a los 90 d de incubación.



**Figura 8.** Eliminación de dormancia en tubérculos de *D. sparsiflora* con con 10 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol. **a)** Brote a los 30 d de incubación. **b)** Brote a los 60 d de incubación.

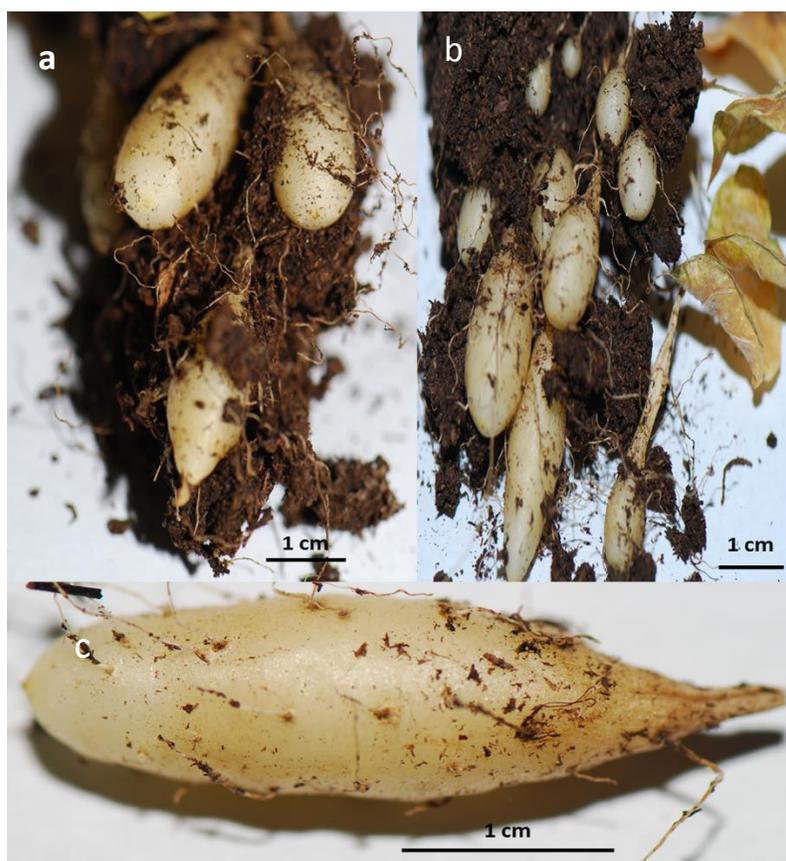
### 6.3. Adaptación de plantas y/o inducción de minitubérculos *ex vitro* de *D. sparsiflora*

Mientras se realizaban experimentos para la inducción de microtubérculos *in vitro* con paclobutrazol, se observó que éste en concentraciones de 1 y 3 mg L<sup>-1</sup> logró que las plantas desarrollaran una gran cantidad de raíz en comparación con las plantas propagadas en medio con 2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina, lo que llevó a suponer que ésta característica ayudaría a una adaptación a condiciones *ex vitro* eficaz de plantas de *D. sparsiflora*. Se ha observado que el paclobutrazol aumenta el diámetro de las raíces en plantas de *Chrysanthemum* cv. Lillian Hoek (Burrows *et al.*, 1992) y promueve el desarrollo masivo de yemas adventicias en *Aechmea fasciata* (Ziv *et al.*, 1986).

En un ensayo preliminar se encontró que las plantas propagadas en medio con 1 y 3 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol después de dos semanas de establecimiento en invernadero, mostraron una supervivencia del 100 %, mientras que las plantas propagadas en medio con 2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina no sobrevivieron al cambio de un ambiente *in vitro* a uno *ex vitro*. A los 60 d de haber pasado las plantas a invernadero las que sobrevivieron comenzaron a desarrollar minitubérculos, los cuales, 60 d después de su aparición ya se encontraban en condiciones de ser cosechados (el proceso completo tomó en total 120 d). Las plantas desarrollaron en promedio cinco minitubérculos por planta, con un peso promedio de 0.7 g (figura 9).

En el experimento donde se utilizaron las accesiones 10, 112, 121, 751 y PA se observó una supervivencia en la adaptación a condiciones *ex vitro* del 100 % en las plantas propagadas en medio MS adicionado con 1 y 3 mg L<sup>-1</sup> y de un 40 % en las plantas propagadas en medio MS adicionado con 2 mg L<sup>-1</sup> de cinetina y solo en las plantas tratadas con paclobutrazol se presentó desarrollo de minitubérculos a los 60 d. Se ha observado que la utilización de paclobutrazol incrementa la acumulación de almidón en bulbos de lirio (*Lilium* Oriental ‘Sorbonne’) (Zheng *et al.*, 2012) y en tubérculos de papa (Tekalign y Hammes, 2005) en condiciones *ex vitro*, pero, a diferencia de este estudio, la forma de aplicación del paclobutrazol se llevó a cabo mediante aplicación foliar o directamente sobre el suelo.

El aumento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo, la adición de retardantes de crecimiento (como el paclobutrazol o el cloruro de cloro colina (CCC)), la poliamina espermina y el aumento del fotoperiodo durante la incubación de los medios de cultivo, resultó eficiente para la obtención de microtubérculos de *Dioscorea sparsiflora*; la producción en masa de microtubérculos impulsará el cultivo a gran escala de esta especie de importancia económica y alimenticia en el estado de Jalisco, México.



**Figura 9.** Obtención de minitubérculos *ex vitro*. a) y b) Plantas con minitubérculos de la accesión 751 de *D. sparsiflora* propagadas previamente en medio MS adicionado con 1 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol y adaptada a condiciones de invernadero. c) Minitubérculo proveniente de plantas de la accesión 751 de *D. sparsiflora* propagadas previamente en medio MS adicionado con 1 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol y adaptada a condiciones de invernadero.

## 7. CONCLUSIONES

- Fotoperiodos de 10 y 12 h resultaron favorables para la obtención de microtubérculos de la accesión PA de *D. sparsiflora* a los 90 d de cultivo *in vitro*.
- La adición de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa al medio de cultivo ayuda a la obtención de microtubérculos *in vitro* de *D. sparsiflora* y esta concentración en combinación con un fotoperiodo de 10 h ayuda a que los microtubérculos obtenidos tengan un mayor peso.
- El paclobutrazol a una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup> ayudó a la obtención de microtubérculos *in vitro* de la accesión 751 de *D. sparsiflora*.
- Más de cinco microtubérculos se obtuvieron *in vitro* de la accesión 121 de *D. sparsiflora* con 1 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol.
- La poliamina espermina en concentraciones de 10 y 15 mg L<sup>-1</sup> induce la formación de microtubérculos de la accesión 121 de *D. sparsiflora* a los 120 d de cultivo *in vitro*.
- Una concentración de 10 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol estimula la brotación de tubérculos en estado de dormancia de *D. sparsiflora*.
- Propagar plantas de *D. sparsiflora* en medio MS adicionado con 1 y 3 mg L<sup>-1</sup> de paclobutrazol por un mes ayuda a una eficiente adaptación a condiciones de invernadero y estimula una alta producción de minitubérculos.

## 8. LITERATURA CITADA

- Ahmed, F., y Urooj, A. (2008). *In vitro* starch digestibility characteristics of *Dioscorea alata* tuber. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 3(2), 29-33.
- Aksenova, N. P., Sergeeva, L. I., Konstantinova, T. N., Golyanovskaya, S. A., Kolachevskaya, O. O., y Romanov, G. A. (2013). Regulation of potato tuber dormancy and sprouting. *Russian Journal of Plant Physiology*, 60(3), 301-312.
- Alexopoulos, A. A., Akoumianakis, K. A., Vemmos, S. N., y Passam, H. C. (2007). The effect of postharvest application of gibberellic acid and benzyl adenine on the duration of dormancy of potatoes produced by plants grown from TPS. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1), 54-62.
- Al-Hussaini, Z. A., Yousif, S. H., y Al-Ajeely, S. A. (2015). The role of sucrose and light duration on *in vitro* tuberization for two cultivars of potato *Solanum tuberosum* L. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(2), 277-283.
- Andres, C., AdeOluwa, O. O., y Bhullar, G. S. (2017). Yam (*Dioscorea* spp.). In: Thomas, B., Murphy, D. J., y Murray, B. G. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. The Netherlands: Elsevier. pp. 435-441.
- Balogun, M. O. (2009). Microtubers in yam germplasm conservation and propagation: The status, the prospects and the constraints. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 4(1), 1-10.
- Bhattacharjee, R., Gedil, M., Sartie, A., Otoo, E., Dumet, D., Kikuno, H., Lava Kumar, P., y Asiedu, R. (2011). *Dioscorea*. In: C. Kole (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Industrial Crops*. Berlin: Springer. pp. 71-72.
- Bhojwani, S. S., y Dantu, P. K. (2013). *Plant Tissue Culture: An Introductory Text*. India: Springer. pp. 245-274.

- Bonilla, M., y Hernández, O. (2012). Propagación *in vitro* de ñame (*Dioscorea spp.*): una perspectiva en la producción masiva de plántulas y conservación de germoplasma. *Agronomía*, 20(2), 65-76.
- Borges, M., Ceiro, W., Meneses, S., Aguilera, N., Vázquez, J., Infante, Z., y Fonseca, M. (2004). Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 76(1), 87-90.
- Bradshaw, J. E. (2010). *Root and tuber crops*. New York, NY: Springer. p. 141.
- Burrows, G. E., Boag, T. S., y Stewart, W. P. (1992). Changes in leaf, stem, and root anatomy of *Chrysanthemum* cv. Lillian Hoek following paclobutrazol application. *Journal of Plant Growth Regulation*, 11(4), 189.
- Cabrera, M. (2009). Empleo de métodos biotecnológicos para la propagación de ñame. *Biotecnología Vegetal*, 9(4), 195-209.
- Castañeda-Nava, J. (2016). *Uso de herramientas biotecnológicas y de mejoramiento genético como alternativas para el manejo de Dioscorea spp* (Tesis de Doctorado en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas). Universidad de Guadalajara, Zapopan, Jalisco. pp. 56-58.
- Chandrasekara, A., y Kumar, T. J. (2016). Roots and tuber crops as functional foods: A review on phytochemical constituents and their potential health benefits. *International Journal of Food Science*, DOI: 10.1155/2016/3631647.
- Contreras-Pacheco, M., Santacruz-Ruvalcaba, F., García- Fajardo, J. A., Sánchez G, J., Ruíz L, M. A., Estarrón- Espinosa, M., y Castro- Castro, A. (2013). Diosgenin quantification, characterization and chemical composition in a tuber collection of *Dioscorea spp.* in the state of Jalisco, Mexico. *International Journal of Food Science & Technology*, 48(10), 2111-2118.
- Coursey, D. G. (1967). Yam storage—I: a review of yam storage practices and of information on storage losses. *Journal of Stored Products Research*, 2(3), 229-244.

- Coursey, D. G. (1976). Yams: *Dioscorea spp.* (Dioscoreaceae). *Evolution of Crop Plants*. NW Simmonds, Ed.
- Dhital, S. P., y Lim, H. T. (2012). Microtuberization of potato (*Solanum tuberosum L.*) as influenced by supplementary nutrients, plant growth regulators, and *in vitro* culture conditions. *Potato Research*, 55(2), 97-108.
- El-Esawi, M. A. (2016). Nonzygotoc embryogenesis for plant development. In: M. Anis y N. Ahmad (Ed.), *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement*. Singapore: Springer. pp. 583-598.
- Evans, L. T. (1993). *Crop evolution, adaptation and yield*. Cambridge University Press. p. 514.
- FAOSTAT. 2017. Datos estadísticos. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>. Consultado 17 de enero de 2018.
- George, E. F., Hall, M. A., y De Klerk, G. J. (2008). *Plant propagation by tissue culture*. Dordrecht: Springer. pp. 65-113.
- Gong, G., Qin, Y., y Huang, W. (2011). Anti-thrombosis effect of diosgenin extract from *Dioscorea zingiberensis* CH Wright *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine*, 18(6), 458-463.
- Gong, M., Luo, H., Wang, A., Zhou, Y., Huang, W., Zhu, P., y He, L. (2017). Phytohormone profiling during tuber development of Chinese yam by Ultra-high performance Liquid Chromatography–Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Plant Growth Regulation*, 36(2), 362-373.
- González, M. (2012). El ñame (*Dioscorea spp.*) características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 05-15.
- Guízar, A., Montañéz Soto, J. L., y García Ruiz, I. (2008). Parcial caracterización de nuevos almidones obtenidos del tubérculo de camote del cerro (*Dioscorea spp.*). *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 9(1), 81-88.

- Harvey, B. M., Crothers, S. H., Evans, N. E., y Selby, C. (1991). The use of growth retardants to improve microtuber formation by potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 27(1), 59-64.
- Harvey, B. M., Crothers, S. H., Watson, S., y Lee, H. C. (1992). Heat inhibition of tuber development in potato (*Solanum tuberosum* L.): effects on microtuber formation *in vitro*. *Potato Research*, 35(2), 183-190.
- Ile, E. I., Craufurd, P. Q., Battey, N. H., y Asiedu, R. (2006). Phases of dormancy in yam tubers (*Dioscorea rotundata*). *Annals of Botany*, 97(4), 497-504.
- Islam, M. S., Roni, M. Z. K., Jamal Uddin, A. F. M., y Shimasaki, K. (2017). Tracing the role of sucrose in potato microtuber formation '*in vitro*'. *Plant Omics*, 10(1), 15.
- Jones, R. W., Cortez-Madrigal, H., García-Ruíz, I., y O'Brien, C. W. (2011). Species of *Xystus schönherr* (Coleoptera: Curculionidae: Baridinae) are seed predators of wild yams (Dioscoreaceae) in central México. *The Coleopterists Bulletin*, 65(1), 86-87.
- Lang, G. A., Early, J. D., Martin, G. C., y Darnell, R. L. (1987). Endo-, para-, and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *HortScience*, 22(3), 371-377.
- León, J. (1987). *Botánica de los cultivos tropicales*. Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. pp. 488-490.
- Li, J., Yang, D., Yu, K., He, J., y Zhang, Y. (2010). Determination of diosgenin content in medicinal plants with enzyme-linked immunosorbent assay. *Planta Medica*, 76(16), 1915-1920.
- Li, M., Li, J., Liu, W., Liu, L., Lu, J., Niu, J., ... y Yang, Q. (2014). A protocol for *in vitro* production of microtubers in Chinese yam (*Dioscorea opposita*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 78(6), 1005-1009.
- Malagamba, P. (1997). Fisiología y manejo de tubérculos semillas de papa. En: *Producción de Tubérculos-Semillas de Papa*. O Hidalgo (ed.). Centro Internacional de la Papa (CIP). Manual de Capacitación. Lima - Perú. Fascículo 2.2. p. 17.

- Marcos, J., Lacointe, A., Tournebize, R., Bonhomme, R., y Sierra, J. (2009). Water yam (*Dioscorea alata* L.) development as affected by photoperiod and temperature: Experiment and modeling. *Field Crops Research*, 111(3), 262-268.
- Montaldo, A. (1991). *Cultivo de raíces y tubérculos tropicales*. Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. pp. 35-37.
- Mostul, B., y Chazaro, B. M. (1996). Camote del cerro: An edible caudiciform *Dioscorea* from México. *Cactus and Succulent Journal (USA)*, 68(1), 6-8.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Ng, S. Y. C. (1988). *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14(2), 121-128.
- Okubo, H. (2000). Growth cycle and dormancy in plants. In: J. D., Viemont y J. Crabbé (Eds.), *Dormancy in Plants: from whole plant behaviour to cellular control*. Oxon, UK.: CABI Publishing. pp. 1-22.
- Olayemi, J. O., y Ajaiyeoba, E. O. (2007). Anti-inflammatory studies of yam (*Dioscorea esculenta*) extract on wistar rats. *African Journal of Biotechnology*, 6(16), 1913-1915.
- Olivier, K. A., Konan, K. N., Anike, F. N., Agbo, G. N., y Dodo, H. W. (2012). *In vitro* induction of minitubers in yam (*Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex). *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109(1), 179-189.
- Opara, L. U. (2003). Yams: Post Harvest Operation. *Massey University, Palmerston North, New Zealand (Edited by Mejia D, AGST/FAO)* [www.fao.org/inpho/content/compend/text/ch24.Htm](http://www.fao.org/inpho/content/compend/text/ch24.Htm) (last modified Aug. 2003).
- Ovono, P. O., Kevers, C., y Dommès, J. (2007). Axillary proliferation and tuberization of *Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 91(2), 107-114.

- Ovono, P. O., Kevers, C., y Dommes, J. (2010a). Tuber formation and growth of *Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex: interactions between exogenous and endogenous jasmonic acid and polyamines. *Plant Growth Regulation*, 60(3), 247-253.
- Ovono, P. O., Kevers, C., y Dommes, J. (2010b). Tuber formation and development of *Dioscorea cayenensis*-*Dioscorea rotundata* complex *in vitro* effect of polyamines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(1), 81-88.
- Perea, M. (2001). Contribución de la biotecnología al desarrollo sostenible del cultivo del ñame. En: Perea, M. (ed.). *Biotecnología Agrícola*. Bogotá: Editora Guadalupe. pp. 289-301.
- Perea, M., y Buitrago, G. (2000). Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo de ñame. En: M. Guzmán y G. Buitrago. (Ed.), *Ñame: producción de semillas por biotecnología*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, DC.: Editorial Unibiblos. pp. 17-32.
- Pérez, J., Albert, D., Rosete, S., Sotolongo, L., Fernández, M., Delprete, P., y Raz, L. (2005). Consideraciones etnobotánicas sobre el género *Dioscorea* (Dioscoreaceae) en Cuba. *Revista Ecosistemas*, 14(2), 142-149.
- Podwyszyńska, M. (2012). The mechanisms of *in vitro* storage organ formation in ornamental geophytes. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*, 6(1), 9-23.
- Raemaekers, R. H. (2001). *Crop production in tropical Africa*. Belgium: DGIC. pp. 23-27.
- Ramírez-Delgadillo, R., Vargas-Ponce, O., Arreola-Nava, H. J., Cedano-Maldonado, M., González-Tamayo, R., González-Villarreal, L. M.,... y Rodríguez-Contreras, A. (2010). *Catálogo de plantas vasculares de Jalisco*. Guadalajara: Universidad de Guadalajara, Sociedad Botánica de México y Universidad Autónoma Metropolitana. p. 143.
- Ray, R. C., y Sivakumar, P. S. (2009). Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(6), 1073-1087.

- Rodríguez-Delgadillo, W. 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo del ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*, 11(2),133-152.
- Shiwachi, H., Ayankanmi, T., Asiedu, R., y Onjo, M. (2003). Induction of sprouting in dormant yam (*Dioscorea spp.*) tubers with inhibitors of gibberellins. *Experimental Agriculture*, 39(2), 209-217.
- Šimko, I. (1994). Effect of paclobutrazol on *in vitro* formation of potato microtubers and their sprouting after storage. *Biologia Plantarum*, 36(1), 15.
- Struik, P. C., y Wiersema, S. G. (1999). *Seed potato technology*. Netherlands: Wageningen Academic Pub. p. 383.
- Suttle, J.C. (2004). Physiological regulation of potato tuber dormancy. *American Journal of Potato Research*, 81(4), 253-262.
- Tamiru, M., Becker, H. C., y Maass, B. L. (2008). Diversity, distribution and management of yam landraces (*Dioscorea spp.*) in Southern Ethiopia. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 55(1), 115-131.
- Tekalign, T., y Hammes, P. S. (2005). Growth and biomass production in potato grown in the hot tropics as influenced by paclobutrazol. *Plant Growth Regulation*, 45(1), 37-46.
- Téllez, V. O. (1996). *Flora Del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Fascículo 9. Dioscoreaceae* R. Br (Vol. 9). UNAM. pp. 3-13.
- Téllez, V.O. (2009). Base de datos de las *Fabaceae* y *Caesalpinaceae* (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.
- Uchendu, E. E., Sobowale, O. O., Odimegwu, J., y Adetimirin, V. O. (2016). *In vitro* sucrose concentration influences microtuber production and diosgenin content in white yam (*Dioscorea rotundata Poir*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52(6), 563-570.

- Udensi, E. A., Oselebe, H. O., y Iweala, O. O. (2008). The investigation of chemical composition and functional properties of water yam (*Dioscorea alata*): effect of varietal differences. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(2), 342-344.
- Waizel-Bucay, J. (2009). El uso tradicional de las especies del género *Dioscorea*. *Revista de Fitoterapia*, 9(1), 53-67.
- Xu, X., Vreugdenhil, D., y Lammeren, A. A. V. (1998). Cell division and cell enlargement during potato tuber formation. *Journal of Experimental Botany*, 49(320), 573-582.
- Yan, H., Yang, L., y Li, Y. (2011). Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii* Prain et Burk. *Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(2), 193-198.
- Zakaria, M., Hossain, M. M., Mian, M. K., Hossain, T., y Uddin, M. Z. (2008). *In vitro* tuberization of potato influenced by benzyl adenine and chloro choline chloride. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 33(3), 419-425.
- Zheng, R. R., Wu, Y., y Xia, Y. P. (2012). Chlorocholine chloride and paclobutrazol treatments promote carbohydrate accumulation in bulbs of *Lilium Oriental* hybrids 'Sorbonne'. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 13(2), 136-144.
- Ziv, M., Yogev, T., y Krebs, O. (1986). Effects of paclobutrazol and chlormequat on growth pattern and shoot proliferation of normal and variant *Aechmea fasciata* Baker plant regenerated in vitro. *Israel Journal of Botany*, 35(3-4), 175-182.

## ANEXOS

**Anexo 1**

Análisis de varianza para número de microtubérculos de la accesión PA de *Dioscorea sparsiflora* con tres condiciones de fotoperiodo y tres concentraciones de sacarosa a los 90 d de cultivo *in vitro*.

Análisis de Varianza para Microtubérculos - Suma de Cuadrados Tipo III

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Efectos principales					
A:Fotoperiodo	11.3953	2	5.69766	8.35	<b>0.0004</b>
B:Sacarosa	6.02073	2	3.01037	4.41	<b>0.0138</b>
Interacciones					
AB	5.04421	4	1.26105	1.85	0.1228
Residuos	96.8457	142	0.682012		
Total (corregido)	119.881	150			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Pruebas de Múltiple Rangos para Microtubérculos por Fotoperiodo

<b>Fotoperiodo</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
8	48	0.51585	0.119355	X
10	52	1.0098	0.114565	X
12	51	1.17007	0.115775	X

Método: 95.0 porcentaje LSD

## Pruebas de Múltiple Rangos para Microtubérculos por Sacarosa

<b>Sacarosa</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
3	50	0.634804	0.116839	X
9	50	0.942402	0.116839	XX
6	51	1.11852	0.116068	X

Método: 95.0 porcentaje LSD

**Anexo 2**

Prueba de normalidad para número de microtubérculos de la accesión PA de *Dioscorea sparsiflora* con tres condiciones de fotoperiodo y tres concentraciones de sacarosa a los 90 d de cultivo *in vitro*.

## Pruebas de Normalidad para Micotubérculos

<b>Prueba</b>	<b>Estadístico</b>	<b>Valor-P</b>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.810391	<b>0.0</b>

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es menor a 0.05, se puede rechazar la idea de que Micotubérculos proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

**Anexo 3**

Análisis de varianza para número de microtubérculos de la accesión 751 de *D. sparsiflora* con cuatro concentraciones de cloruro de cloro colina (CCC) y cuatro concentraciones de paclbutrazol a los 120 d de cultivo *in vitro*.

## Análisis de Varianza para Microtubérculos - Suma de Cuadrados Tipo III

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Efectos principales					
A:CCC	13.8688	3	4.62292	2.85	<b>0.0398</b>
B:Paclbutrazol	120.769	3	40.2563	24.78	<b>0.0000</b>
Interacciones					
AB	16.6563	9	1.85069	1.14	0.3390
Residuos	233.9	144	1.62431		
Total (corregido)	385.194	159			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

## Pruebas de Múltiple Rangos para Microtubérculos por CCC

<b>CCC</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
0	40	0.5	0.201513	X
250	40	0.725	0.201513	XX
500	40	1.125	0.201513	X
125	40	1.225	0.201513	X

Método: 95.0 porcentaje LSD

## Pruebas de Múltiple Rangos para Microtubérculos por Paclbutrazol

<b>Paclbutrazol</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
0.1	40	0.275	0.201513	X
0	40	0.275	0.201513	X
3	40	0.65	0.201513	X
1	40	2.375	0.201513	X

Método: 95.0 porcentaje LSD

**Anexo 4**

Prueba de normalidad para número de microtubérculos de la accesión 751 de *D. sparsiflora* con cuatro concentraciones de cloruro de cloro colina (CCC) y cuatro concentraciones de paclbutrazol a los 120 d de cultivo *in vitro*.

Pruebas de Normalidad para Microtubérculos

<b>Prueba</b>	<b>Estadístico</b>	<b>Valor-P</b>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.643629	<b>0.0</b>

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es menor a 0.05, se puede rechazar la idea de que Microtubérculos 120 proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

**Anexo 5**

Análisis de varianza para número de microtubérculos de la accesión 121 de *D. sparsiflora* con cuatro concentraciones de paclbutrazol a los 120 d de cultivo *in vitro*.

ANVA para Microtubérculos por Paclbutrazol

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Entre grupos	64.475	3	21.4917	<b>4.33</b>	<b>0.0104</b>
Intra grupos	178.5	36	4.95833		
Total (Corr.)	242.975	39			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

## Pruebas de Múltiple Rangos para Microtubérculos por Paclobutrazol

<b>Paclobutrazol</b>	<b>Casos</b>	<b>Media</b>	<b>Grupos Homogéneos</b>
3	10	2.1	X
0	10	2.2	X
0.1	10	2.6	X
1	10	5.2	X

Método: 95.0 porcentaje LSD

**Anexo 6**

## Pruebas de Normalidad para Microtubérculos

<b>Prueba</b>	<b>Estadístico</b>	<b>Valor-P</b>
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0.913232	<b>0.0049379</b>

Debido a que el valor-P más pequeño de las pruebas realizadas es menor a 0.05, se puede rechazar la idea de que Microtubérculos proviene de una distribución normal con 95% de confianza.