

EFFECTO DE LOS OSMOLITOS SACAROSA, MANITOL Y SORBITOL EN LA CONSERVACION IN VITRO DE *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* Y *D. trifida* POR EL MÉTODO DE CRECIMIENTO MÍNIMO

EFFECT OF OSMOLYTES SUCROSE, MANNITOL AND SORBITOL IN CONSERVATION IN VITRO OF *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* and *D. trifida* UNDER SLOW-GROWTH

Oscar Elías Carmona Wilches, Lucía Candelaria Díaz Narváez, Javier Darío Beltrán Herrera.

Universidad de Sucre, Grupo de Investigación Biotecnología Vegetal (Biovus).

Recibido: Agosto 30 de 2013

Aceptado: Septiembre 20 de 2013

*Correspondencia del autor. Sincelejo-Sucre; Barrio: Barlovento, Cr 4 N° 25G-2. E mail: menfis2226@hotmail.com.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo establecer medios de cultivo eficientes para la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de segmentos uninodales de las especies *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida*, durante un periodo de 7 meses, mediante la modificación del medio de cultivo base MS; con los siguientes osmolitos: sacarosa, manitol y sorbitol. Se evaluaron seis tratamientos (T) en los siguientes porcentajes: T₁ (3% sacarosa), T₂ (1.5% manitol), T₃ (2% sorbitol), T₄ (1.5% sacarosa + 1.5% manitol), T₅ (1.5% sacarosa + 2% sorbitol) y T₆ (1.5% manitol + 2% sorbitol). Luego, se evaluaron, cada 30 días: supervivencia (%), hojas expandidas (%), longitud del tallo y raíz, número de nudos, ápices y raíces, fenolización (%), senescencia foliar (%) y callo (%). Los resultados mostraron que las especies *Dioscorea alata* y *D. bulbifera* se conservan mejor empleando la combinación manitol-sorbitol (1,5-2%), mientras que *D. rotundata* y *D. trifida*, responden de forma más adecuada al uso individual de manitol (1,5%) y sorbitol (2%) respectivamente. En conclusión estos osmoreguladores, y su combinación, permiten prolongar los periodos de subcultivo, y por ende la conservación efectiva de vitroplantas a partir de segmentos uninodales de ñame, garantizando una tasa de crecimiento reducida del cultivo, así como un alto índice de supervivencia y viabilidad del material vegetal.

Palabras clave: *Dioscorea* spp., conservación *in vitro*, sacarosa, manitol, sorbitol.

ABSTRACT

This study aimed to establish an efficient culture media for in vitro conservation of uninodal segments of the species *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* and *D. trifida*, for a 7 months period; by modifying MS media culture with the following osmolytes: sucrose, mannitol and sorbitol: Six treatments (T) were evaluated in the following percentages: T1 (3% sucrose), T2 (1.5% mannitol), T3 (2% sorbitol), T4 (1.5% sucrose + 1.5% mannitol), T5 (1.5% sucrose + 2% sorbitol) and T6 (mannitol 1.5% + 2% sorbitol). Treatments were evaluated every 30 days for: survival (%), expanded leaves (%), length of stem and roots, number of leaves, shoots and roots, phenolization (%), leaf senescence (%) and callus (%). The results showed that *Dioscorea alata* and *D. bulbifera* are better conserved using the combination mannitol-sorbitol (1.5-2%), while *D. rotundata* and *D. trifida*, adequately respond to the individual use of mannitol (1.5%) and sorbitol (2%) respectively. In conclusion these sugars, and their combination, allow extended subculture periods, supporting the effective conservation of yams, using stem node explants; ensuring a reduced growth rate of the plantlets, with a high survival rate and viability of the species evaluated.

Keywords: *Dioscorea* spp., in vitro conservation, sucrose, mannitol, sorbitol.

INTRODUCCIÓN

El ñame (*Dioscorea* sp) es un miembro de la familia Dioscoreaceae, la cual comprende más de 650 especies(1). El género *Dioscorea*, perteneciente a esta familia, posee una amplia distribución en la zona tropical y puede ser cultivado por su actividad medicinal o comestible, debido a que este género se caracteriza por la presencia de antioxidantes y almacenamiento de almidones en sus tubérculos (2).

Este cultivo constituye la base de la seguridad alimentaria y económica de numerosas familias de pequeños productores en la costa Atlántica, en especial en el departamento de Sucre, donde las especies más cultivadas son *Dioscorea rotundata* y *Dioscorea alata*, con un 75% de la cantidad total cultivada, mientras que el 25% restante con las especies *Dioscorea esculenta*, *D. trifida* y *D. bulbifera* (3).

Estas especies de ñame en campo se encuentran expuestas al ataque de plagas, enfermedades (antracnosis, mosaico del ñame), nematodos, insectos, roedores y condiciones ambientales adversas que acaban provocando la erosión genética del género *Dioscorea* (2); lo cual compromete la base de la seguridad alimentaria y económica de las familias que dependen de este cultivo.

En este sentido, la solución a este problema puede ser lograda mediante la conservación del cultivo del ñame en un banco de germoplasma *in vitro*, lo cual permitirá encarar el reto que supone garantizar la seguridad alimentaria de la región hacia el futuro inmediato, ya que gracias al mantenimiento de la diversidad genética de

las variedades del cultivo, es posible satisfacer las necesidades continuas de diferentes usuarios, tales como productores, consumidores y fitomejoradores (4).

Sin embargo, en la actualidad no se cuenta con una metodología estandarizada para la conservación *in vitro* de las especies *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida*, que se encuentran almacenadas en el banco de germoplasma de la Universidad de Sucre. Actualmente, el mantenimiento de estos recursos fitogenéticos se hace mediante el método convencional de micropropagación, en el cual las plántulas crecen aceleradamente, agotando el medio de cultivo en tiempos relativamente cortos, y produciendo un deterioro prematuro de estas.

Este fenómeno provoca que las plantulas necesiten ser subcultivadas a un nuevo medio de cultivo en periodos de tiempo muy cortos (3 a 4 meses), lo cual genera incrementos en los costos de mantenimiento por una mayor demanda de tiempo y mano de obra para la conservación *in vitro* de este germoplasma. Adicionalmente, existe el riesgo de que la realización frecuente de subcultivos pueda afectar la estabilidad genética de las accesiones, y comprometer la asepsia de las mismas.

Este problema ha sido abordado por investigadores como Hanson (2) en el año 1986, quien encontró que al usar sustancias retardantes del crecimiento como el manitol es posible resguardar la especie *Dioscorea rotundata* por un periodo de tiempo que oscila entre 1.5 y 2 años.

Asimismo, Borges (2) *et al.*, demostró que es posible

conservar de manera eficaz las vitroplantas de ñame a partir de segmentos uninodales de *D. alata* clon cara-queño, hasta por 12 meses, mediante el uso de las sales MS al 75% + vitaminas MS + sacarosa 30 g.L⁻¹ + carbón activado 2g.L⁻¹ + BAP 0,1 mg.L⁻¹.

Además, el sorbitol ha sido reportado en diversas investigaciones como un excelente agente osmótico capaz de reducir el crecimiento de algunas especies, entre las cuales se incluyen *Globe artichoke* (5), fresa (6), pome-lo (7) y uva (8).

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo establecer medios de cultivo eficientes para la conservación *in vitro*, por crecimiento mínimo, de diferentes accesiones pertenecientes al banco de germoplasma de ñame de la Universidad de Sucre, durante un periodo de 7 meses basado en la modificación del medio de cultivo con distintos niveles de sacarosa, manitol y sorbitol de forma individual y combinada, permitiendo evaluar su viabilidad en el tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon segmentos uninodales desprovistos de hojas con una longitud promedio de 1 cm, obtenidos de vitroplantas cultivadas durante 3 meses, las cuales a su vez se obtuvieron a partir de plantas donantes de ñame (*Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida*) procedentes del Banco de germoplasma de la Universidad de Sucre, las cuales fueron cultivadas en condiciones semicontroladas.

Conservación *in vitro*

El medio de cultivo para las especies *D. alata* y *D. trifida*, estuvo compuesto por las sales de Murashige y Skoog, carbón activado 2.0g/L, ANA 0.1 mg/L, BAP 0.3 mg/L, tiamina 100 mg/L, mioinositol 0.1 g/L, agar 8.0 g/L; modificado con la utilización de diferentes fuentes de carbono (sacarosa, manitol y sorbitol), las cuales fueron empleadas en distintos niveles, dando lugar, en su mismo orden, a los siguientes tratamientos: T₁: (3; 0; 0%), T₂: (0; 1.5, 0%), T₃: (0; 0; 2%), T₄: (1.5; 1.5; 0%), T₅: (1.5; 0; 2%) y T₆: (0; 1.5; 2%).

Asimismo, los medios de cultivo para las especies *D. bulbifera* y *D. rotundata*, estuvieron constituidos por las sales de Murashige y Skoog, ANA 0.5 mg/L, BAP 4.0 mg/L, tiamina 100 mg/L, mioinositol 0.1 g/L, agar 8.0 g/L, modificado con la utilización de diferentes fuen-

tes de carbono (sacarosa, manitol y sorbitol), las cuales fueron empleadas en distintos niveles, dando lugar al mismo orden de tratamientos anotados anteriormente.

Posteriormente el pH del medio de cultivo se ajustó a 5.8, luego de 10 minutos, en un calentador agitador magnético Corning®, se disolvió el agar. Luego, el medio se distribuyó en frascos de 11cm alto x 4.7cm de diámetro, a razón de 20 ml por frasco. Finalmente se esterilizó en la autoclave (Sterilof®) durante 20 minutos a 15 PSI y 121 °C de temperatura.

Previamente a la siembra, los medios de cultivo se mantuvieron 7 días en observación antes de su uso para descartar cualquier contaminación en los mismos. Las manipulaciones *in vitro* se desarrollaron bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar horizontal (Astrocel®), en condiciones de laboratorio, a temperatura e iluminación controladas (Temperatura de 28± 5°C, Humedad Relativa del 65% y un Fotoperiodo de 12 horas luz con una Intensidad Lumínica de 50 μmol m⁻²s⁻¹).

Siembra de los explantes y condiciones de cultivo

Los segmentos uninodales se cortaron a una longitud promedio de 1cm y se colocaron, obedeciendo a la polaridad de la planta, a razón de un explante por frasco. Este proceso fue realizado bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar horizontal (Astrocel®). Una vez sellados los recipientes con papel aluminio y cristaflex se ubicaron en el cuarto de incubación en las condiciones anteriormente anotadas.

Evaluación de la conservación *in vitro*

Los procesos de crecimiento y desarrollo, así como los relacionados con el envejecimiento y deterioro de las vitroplantas, fueron evaluados cada 30 días durante 7 meses de cultivo *in vitro*, mediante la observación y medición de las siguientes variables con sus respectivos indicadores:

Variables relacionadas con los procesos de crecimiento y desarrollo:

- Supervivencia (%): número de explantes vivos/ número total de explantes.
- Hojas expandidas (%): Número de hojas expandidas/ número de hojas totales.
- Tallo: Longitud del tallo en centímetros (se midió desde la base del explante hasta el último nudo).

- Nudos: Número de nudos de novo por explante.
- Raíces: Número de raíces y longitud de la raíz principal medida en centímetros.
- Ápices: Número de ápices por explante.

Variables relacionadas con los procesos de envejecimiento y deterioro:

- Fenolización (%): Número de explantes que presenten algún grado de fenolización/Número total de explantes.
- Senescencia foliar (%): Número de hojas muertas/número total de hojas.
- Callo (%): Número de explantes que presentan presencia de algún grado de proliferación celular o callo/ número total de explantes.

Diseño y análisis estadístico

El experimento de conservación *in vitro*, se realizó bajo un diseño completamente al azar (DCA), formado por seis tratamientos, cada uno con 15 repeticiones para cada una de las especies de ñame (*Dioscorea rotundata*, *D. alata*, *D. trifida*, y *D. bulbifera*).

Adicionalmente se aplicaron las pruebas de normalidad (ShapiroWilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett), a las variables cuantitativas (hojas expandidas %, longitud del tallo y raíz, así como el número nudos, raíces, ápices y senescencia foliar%), tras lo cual, aquellas distribuidas de forma normal y homogénea fueron sometidas a un análisis de varianza, seguido por la prueba de Tukey(α : 0.05), mientras que en caso contrario se realizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, seguida de la prueba DMS (Diferencia Mínima Significativa).

Por otra parte, las variables cuyo resultado observado involucra la relación presencia-ausencia son consideradas cualitativas, tal como sucede con el porcentaje de supervivencia, fenolización y callo, las cuales fueron analizadas mediante el uso de pruebas de contingencia e independencia de dos proporciones (Chi-cuadrado). Todos los análisis estadísticos fueron procesados en el programa R (9) (R Developmentcoreteam 2012 para Windows, versión 2.1.14. con el paquete agricolae versión 1.1-3. 2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo 1: *Dioscorea alata*

Transcurridos los primeros meses del ensayo, se presentaron inconvenientes en el T₄, produciéndose pérdida de unidades experimentales, por las cuales no se colectaron datos de este tratamiento.

Los resultados muestran que los tratamientos T₁, T₃, T₅ y T₆ presentaron los valores más altos en el porcentaje de supervivencia, a diferencia del tratamiento T₂ quien obtuvo el menor valor y se considera estadísticamente diferente al resto del grupo, tal como se muestra en la tabla 1.

Los resultados muestran que los tratamientos T₁, T₃, T₅ y T₆ presentaron los valores más altos en el porcentaje de supervivencia, a diferencia del tratamiento T₂ quien obtuvo el menor valor y se considera estadísticamente diferente al resto del grupo, tal como se muestra en la tabla 1.

Asimismo, estos resultados evidencian que el uso de azúcares alcohólicos, como agentes osmóticos, afectan la supervivencia *in vitro* de *D. alata*, ya que tienen la capacidad de alterar el potencial osmótico de las células en cultivo, el cual al hacerse más negativo, reduce la absorción de agua y en consecuencia provoca una baja disponibilidad de nutrientes, siendo precisamente la falta de estos, lo que ocasiona la muerte de los explantes. Por consiguiente los resultados anteriores concuerdan con los reportados por la bibliografía en cuanto a que el manitol ejerce una influencia mucho mayor que el sorbitol al reducir la disponibilidad de nutrientes y posterior muerte de los explantes, ya que genera un potencial osmótico más negativo (10).

Por otra parte, el número de nudos y raíces no se ve afectado por el uso de diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo, lo cual concuerda con lo reportado por Borges(2) et al.

Adicionalmente, la longitud de raíces y tallo se comportaron de forma similar, siendo los tratamientos T₂ y T₆, quienes obtuvieron los valores más reducidos en estas variables, debido al estrés osmótico generado por el uso de manitol, también reportado como un azúcar metabólicamente inerte.

Tabla 1. Variables determinantes de los procesos de crecimiento y desarrollo en *D. alata* a los 7 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Sup (%)	H. Exp(%)	L. Tallo	N. Nudos	N. Raíces	L. Raíz	N. ápices
T ₁	100,00 a*	66,67 ab*	5,67 a	8,93 a*	6,71 a*	4,36 a	16,93 ab*
T ₂	55,56 b	65,35 ab*	2,14 b*	7,40 a*	4,80 a*	1,48 b*	16,00 ab*
T ₃	84,62 a*	91,15 a	4,78 a	9,91 a*	8,91 a*	3,94 a	14,91 b*
T ₅	100,00 a*	57,44 b*	5,19 a	9,36 a*	8,45 a*	3,74 a	19,55 ab*
T ₆	100,00 a*	39,77 b*	3,10 b*	11,54 a*	7,23 a*	3,06 ab*	26,69 a

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para $p < 0,05$, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T₁: Sacarosa 3%

T₂: Manitol 1.5%

T₃: Sorbitol

2% T₅: Sacarosa 1.5% + Sorbitol 2%

T₆: Manitol 1.5% + Sorbitol 2%

Con respecto al porcentaje de hojas expandidas, se obtuvo que el valor más alto fue presentado por el tratamiento T₃, seguido por los tratamientos T₁ y T₂, siendo los tratamientos T₅ y T₆, quienes alcanzaron los valores menores. En este caso, el uso de sorbitol como fuente de carbono parece estimular el desarrollo de las hojas en esta especie, por lo cual una vez absorbido ejerce su efecto sobre esta variable, sin embargo, en la medida que el potencial osmótico del medio se hace más negativo, es más difícil absorber este componente y por tanto su efecto desaparece, tal como sucede en los tratamientos T₅ y T₆, en los cuales el desarrollo de las hojas fue considerablemente menor.

Por otro lado, según los resultados obtenidos, el uso individual de sacarosa o manitol provoca los mismos resultados en la especie *D. alata* sobre el número de ápices, sin embargo, la presencia individual del sorbitol genera una reducción en la aparición de los mismos, por lo cual es posible decir que este componente por sí mismo no contribuye de forma eficiente a estimular la aparición de nuevos ápices. No obstante, al combinarse con otros osmoreguladores como la sacarosa y el manitol se obtienen resultados considerablemente superiores. Lo anterior sugiere un efecto sinérgico entre ambos componentes, especialmente cuando se combinan en el medio de cultivo el manitol con el sorbitol.

Con relación a las variables que determinan los procesos de envejecimiento y deterioro (Tabla 2), es posible afirmar que el uso de las diferentes fuentes de carbono empleadas, no influye significativamente en la secreción de compuestos fenólicos al medio de cultivo. En este sentido, la ausencia de compuestos tóxicos secretados al medio de cultivo se debe al uso de carbón activado, el cual actúa como antioxidante, neutralizando los posibles efectos tóxicos generados por estos, mediante

la inhibición o adsorción de la polifenoloxidasas y los productos que genera (11).

Los resultados obtenidos en este ensayo, indican que la aparición de callo no se ve afectada por el uso de diferentes osmoreguladores en el medio de cultivo, lo cual coincide con lo reportado por Acedo y Arradoza(12), quienes evaluaron el efecto de diferentes retardantes osmóticos como el manitol sobre la estabilidad morfológica de la especie *D. alata*, encontrando que estas condiciones de cultivo no generan alteraciones indeseadas para la planta.

Adicionalmente, este experimento revela que el efecto individual y combinado de fuentes de carbono fácilmente metabolizables como la sacarosa, promueven el rápido desarrollo del explante, lo cual acaba acelerando su deterioro y envejecimiento. Efecto que se ve notoriamente representado por la presencia de numerosas hojas muertas. Mientras que al emplear osmolitos como el sorbitol y manitol, se obtiene el efecto contrario, debido al estrés osmótico generado por ellos, el cual impide la absorción y consecuente metabolización de los nutrientes en el medio de cultivo (10).

Con base a lo anteriormente expuesto, es posible afirmar que durante los 7 meses de conservación evaluados, la especie *Dioscorea alata* responde de forma más adecuada al tratamiento T₆, es decir, que el uso combinado en el medio de cultivo de manitol-sorbitol permite la conservación *in vitro* de esta especie durante el tiempo estipulado, ya que este tratamiento posee el mayor número de atributos deseados, tales como presentar el menor crecimiento y desarrollo con respecto a la longitud del tallo y raíz, así como un porcentaje significativamente reducido de hojas expandidas y muertas, manteniendo una tasa de supervivencia del 100%, con

Tabla 2. Variables determinantes de los procesos de envejecimiento y deterioro en *D. alata* a los 7 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Feno (%)	H. Muertas (%)	Callo (%)
T ₁	0,00 a*	7,59 ab*	28,57 a*
T ₂	0,00 a*	0,00 b*	0,00 a*
T ₃	0,00 a*	1,01 b*	0,00 a*
T ₅	0,00 a*	6,08 a	18,18 a*
T ₆	0,00 a*	1,09 ab*	23,08 a*

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para p<0,05, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T₁: Sacarosa 3%

T₂: Manitol 1.5%

T₃: Sorbitol

2% T₅: Sacarosa 1.5% + Sorbitol 2%

T₆: Manitol 1.5% + Sorbitol 2%

lo cual es posible garantizar la disponibilidad de este recurso y predecirse su viabilidad posterior a este periodo de evaluación. Ver tablas 1 y 2.

Ensayo 2: *Dioscorea bulbifera*

Los resultados obtenidos en este ensayo indican que el uso de diferentes reguladores osmóticos, afecta significativamente la supervivencia de la especie *Dioscorea bulbifera*, especialmente cuando se emplea manitol a una concentración del 1.5%, la cual reduce la supervivencia de esta especie a la mitad.

Asimismo, Los resultados sugieren que en la especie *D. bulbifera* la reducción del potencial osmótico es una medida efectiva para reducir el crecimiento y desarrollo de las raíces en las vitroplantas. Sin embargo, este efecto solo tiene lugar cuando el medio de cultivo carece de sacarosa, lo cual permite a los agentes osmóticos como el manitol y sorbitol impedir la absorción de agua y nutrientes, reduciendo así la cantidad de elementos disponibles para el desarrollo de la planta, ocasionándole un retraso en su crecimiento. Además, se observa

que el uso individual de manitol inhibe por completo la aparición de dichas estructuras en el explante, razón por la cual es considerado inadecuado para la conservación de esta especie, sin embargo al emplearse en conjunto con el sorbitol, se genera un desarrollo radicular adecuado. El cual también puede obtenerse mediante el uso individual de sorbitol.

Con respecto a la longitud del tallo, número de ápices y porcentaje de hojas expandidas, se observa que el uso de manitol individual o combinada con sorbitol, generan una reducción adecuada en el desarrollo de estas variables, debido a la negativización del potencial osmótico, así como a la imposibilidad de la especie por metabolizar de forma eficiente estas fuentes de carbono. Lo cual acaba retrasando el desarrollo de la planta.

Por otro lado, la sacarosa juega un papel fundamental en el desarrollo *in vitro* de la especie *D. bulbifera*, ya que en presencia de este componente se alcanzaron los valores más elevados, independientemente del uso simultaneo de otros agentes osmóticos tales como el ma-

Tabla 3. Variables determinantes de los procesos de crecimiento y desarrollo en *D. bulbifera* a los 7 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Sup (%)	H. Exp(%)	L. Tallo	N. Nudos	N. Raíces	L. Raíz	N. ápices
T ₁	100,00 a*	87,35 a	8,09 a	15,79 a*	11,88 a	4,36 a	23,79 a
T ₂	46,15 b	23,33 b*	1,22 c*	1,17 c	0,00 b	0,00 c	3,33 c*
T ₃	93,33 a*	75,15 a	4,16 b	5,57 b	2,36 b*	1,56 b*	9,43 b
T ₄	100,00 a*	87,01 a	3,15 b	12,93 a*	9,00 a	3,71 a	22,87 a
T ₅	100,00 a*	82,05 a	7,49 a	11,21 a*	15,14 a	5,14 a	24,07 a
T ₆	57,14 b	43,47 b*	1,73 c*	2,88 bc	0,88 b*	0,17 bc*	7,25 bc*

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para p<0,05, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T₁: Sacarosa 3%

T₃: Sorbitol 2%

T₅: Sacarosa 1.5% + Sorbitol 2%

T₂: Manitol 1.5%

T₄: Sacarosa 1.5% + Manitol 1.5%

T₆: Manitol 1.5% + Sorbitol 2%

Tabla 4. Variables que determinan los procesos de envejecimiento y deterioro en *D. bulbifera* a los 7 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Feno (%)	H. Muertas (%)	Callo (%)
T ₁	64,20 b*	1,45 a*	28,57 a
T ₂	66,67 a	0,00 a*	0,00 b*
T ₃	100,00 a	2,48 a*	50,00 a
T ₄	53,33 b*	0,63 a*	46,67 a
T ₅	35,71 b*	4,08 a*	71,43 a
T ₆	62,50 b*	0,00 a*	12,50 b*

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para $p < 0,05$, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T₁: Sacarosa 3%

T₃: Sorbitol 2%

T₅: Sacarosa 1.5% + Sorbitol 2%

T₂: Manitol 1.5%

T₄: Sacarosa 1.5% + Manitol 1.5%

T₆: Manitol 1.5% + Sorbitol 2%

nitil, quien al ser empleado individualmente ocasiona una reducción bastante pronunciada en el desarrollo de nuevos nudos. Por tanto es posible afirmar que la sacarosa contrarresta los efectos de otros osmoreguladores, sin desconocer que es una fuente de carbono altamente metabolizable.

Al tener en cuenta las variables que determinan los procesos de envejecimiento en *Dioscorea bulbifera*, se encontró que el uso de diferentes fuentes de carbono no afecta la senescencia foliar, sin embargo, la secreción de compuestos fenólicos fue observada en todos los tratamientos, siendo T₂ y T₃, quienes obtuvieron los valores más altos. Este fenómeno produjo la oxidación de los explantes, la cual está fuertemente ligada a la supervivencia de las plantas, ya que estas sustancias suelen ser tóxicas para el explante en desarrollo.

Por otra parte, estos resultados parecen sugerir que el uso individual de sorbitol en el medio de cultivo, estimula la formación de callo, es decir que promueve la aparición de tejidos con un crecimiento desorganizado, posiblemente porque a la especie *D. bulbifera* este osmoregulador le ocasiona un estrés significativo, que acaba alterando sus patrones normales de crecimiento. Asimismo, el efecto causado por el sorbitol podría llegar a ser potenciado por su uso en conjunto con la sacarosa, la cual tiene la capacidad de promover el desarrollo inadecuado de los tejidos al emplearse de forma individual o combinada en esta especie. Asimismo, este fenómeno puede prevenirse mediante el uso de manitol en el medio de cultivo, siempre y cuando no se encuentre en conjunto con la sacarosa.

En este sentido, el análisis de los resultados sugiere que la especie *D. bulbifera* se caracterizó por su susceptibilidad frente a los tratamientos empleados en esta investigación, por lo cual se dificulta la selección de un

medio adecuado para su conservación *in vitro*, ya que aquellos tratamientos con un alto porcentaje de supervivencia, también presentan un elevado porcentaje de callos, lo cual no es aconsejable para la conservación *in vitro* de una especie. Sin mencionar que en caso contrario, aunque este porcentaje sea bajo, el porcentaje de supervivencia es reducido, lo cual tampoco es deseable.

Teniendo en cuenta lo anterior, es posible afirmar que el tratamiento T₆, ofrece las mejores condiciones para la conservación *in vitro* de la especie *D. bulbifera*, sin embargo, debido a su relativamente bajo porcentaje de supervivencia, las concentraciones de manitol y sorbitol deben ser ajustadas en el medio de cultivo, el cual debe ser modificado con la adición de carbón activado para obtener mejores resultados.

Ensayo 3: *Dioscorea rotundata*

El efecto de diferentes reguladores osmóticos sobre la tasa de supervivencia y el porcentaje de hojas expandidas en la especie *Dioscorea rotundata*, resultó ser nulo, ya que todos los tratamientos generan resultados similares para estas variables.

Por otro lado, este ensayo demuestra que *D. rotundata* al igual que *D. bulbifera* experimenta una reducción en el número de raíces cuando los segmentos nodales se desarrollan en medios de cultivo con ausencia total de sacarosa. De lo anterior se deduce que los tratamientos T₂, T₃, y T₆ ejercen un efecto importante como reguladores osmóticos sobre el crecimiento de estas especies, produciendo una disminución en el número de raíces y por consiguiente en el crecimiento. Estos resultados no coinciden con los propuestos por Páez y González(13), quienes conservaron la especie *Solanum tuberosum* durante 5 meses, encontrando que la combinación de sacarosa- manitol producía el mayor número de raíces.

Tabla 5. Variables determinantes de los procesos de crecimiento y desarrollo en *D. rotundata* a los 7 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Sup (%)	H. Exp(%)	L. Tallo	N. Nudos	N. Raíces	L. Raíz	N. ápices
T ₁	100 a*	77,62 a*	3,14 ab	9,64 ab*	10,64 ab	4,03 b	18,86 bc*
T ₂	100 a*	58,49 a*	1,53 d*	4,15 c	1,85 c*	0,21 c*	14,23 c*
T ₃	100 a*	60,97 a*	2,65 ab	12,31 a*	2,54 c*	1,28 c*	29,46 a
T ₄	100 a*	82,01 a*	2,29 bc	9,64 ab*	7,50 b	2,43 b	22,14 ab
T ₅	100 a*	82,51 a*	3,52 a	9,79 ab*	14,21 a	5,71 a	19,50bc*
T ₆	100 a*	70,20 a*	1,83 cd*	7,50 b	3,10 c*	0,82 c*	23,10 ab

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para p<0,05, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T₁: Sacarosa 3%

T₃: Sorbitol 2%

T₅: Sacarosa 1.5% + Sorbitol 2%

T₂: Manitol 1.5%

T₄: Sacarosa 1.5% + Manitol 1.5%

T₆: Manitol 1.5% + Sorbitol 2%

Los resultados evidencian que la variable longitud del tallo presento diferencias estadísticamente significativas entre sus tratamientos, siendo el T₂ y T₆, quienes obtuvieron los valores más reducidos. Por esta razón son considerados tratamientos adecuados para la conservación *in vitro* de esta especie. Lo anterior se debe a la negativización del potencial osmótico del medio de cultivo por el efecto del manitol, lo cual dificulta la absorción de agua y nutrientes, ocasionando una reducción en el crecimiento de la planta, este fenómeno, también ha sido observado en las investigaciones realizadas por Brown(14).

Con respecto a la formación de nuevos nudos, se observó que los tratamientos con valores estadísticamente superiores son el T₁, T₃, T₄ y T₅, estos resultados indican que el uso de sacarosa o sorbitol son excelentes para generar nudos nuevos, sin embargo al combinarse estas dos azúcares en el medio de cultivo, no se potencia este efecto, probablemente debido al estrés osmótico tan fuerte que se genera, lo cual impide la absorción de agua y con ella la obtención de nutrientes que pueden ser metabolizados por la planta(15).

Los resultados obtenidos, evidencian que el tratamiento T₂ es el mejor tratamiento para disminuir la generación de ápices y con esto el crecimiento de *D. rotundata*. Sin embargo, este efecto se ve disminuido si se emplea en conjunto con otros osmorreguladores como el sorbitol, el cual favorece la aparición de nuevos ápices en esta especie.

Por otra parte, con respecto a las variables que determinan los procesos de envejecimiento y deterioro es posible afirmar que no existe un efecto significativo en la secreción de compuestos fenólicos o en la formación de callos, por emplear distintas fuentes de carbono en el medio de cultivo, tal como se muestra en la tabla 6. Sin embargo, los resultados indican que la senescencia foliar en esta especie se potencia al utilizar sorbitol como agente osmótico, por lo cual es posible afirmar que este compuesto no aporta un efecto adecuado para retardar el envejecimiento de los segmentos nodales y por tanto no es favorable para la conservación *in vitro* de esta especie. En este sentido, el uso de manitol en forma aislada o combinada se consideran opciones adecuadas para alcanzar esta finalidad, ya que el uso

Tabla 6. Variables que determinan los procesos de envejecimiento y deterioro en *D. rotundata* a los 7 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Feno (%)	H. Muertas (%)	Callo (%)
T ₁	28,57 a*	3,43 ab*	0,00 a*
T ₂	7,69 a*	0,75 b*	7,69 a*
T ₃	0,00 a*	14,23 a	0,00 a*
T ₄	28,57 a*	0,89 b*	0,00 a*
T ₅	35,71 a*	2,08 b*	14,29 a*
T ₆	10,00 a*	1,88 b*	0,00 a*

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para p<0,05, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T₁: Sacarosa 3%

T₃: Sorbitol 2%

T₅: Sacarosa 1.5% + Sorbitol 2%

T₂: Manitol 1.5%

T₄: Sacarosa 1.5% + Manitol 1.5%

T₆: Manitol 1.5% + Sorbitol 2%

de estos osmorreguladores generan los porcentajes más bajos de senescencia foliar, al igual que sucede cuando se utiliza la combinación sacarosa-sorbitol.

Teniendo en cuenta los planteamientos anteriormente mencionados es posible afirmar que el tratamiento T₂ es el mejor para la conservación *in vitro* de la especie *D. rotundata*, ya que logro reducir significativamente su crecimiento y desarrollo en cuanto a las variables longitud del tallo y raíz, así como también en el número de raíces y ápices, manteniendo el menor índice de senescencia foliar y garantizando el mayor porcentaje de supervivencia. Adicionalmente, se debe tener en cuenta que aunque el número de nudos logrados por este tratamiento fue reducido, es viable para regenerar exitosamente la especie.

Ensayo 4: Dioscorea trifida

Los resultados obtenidos en este ensayo, evidencian que no existe un efecto significativo en la tasa de supervivencia de la especie *D. trifida*, obteniéndose valores estadísticamente similares para cada uno de los tratamientos. Lo cual indica que el estrés generado por los diferentes reguladores osmóticos es adecuado para retrasar el crecimiento sin causar efectos negativos en la supervivencia de la especie.

En este ensayo se observó que *D. trifida* experimenta una reducción en el número de raíces cuando los segmentos nodales se desarrollan en medios de cultivo con ausencia total de sacarosa. De lo anterior se deduce que los tratamientos T₂ y T₃, ejercen un efecto importante como reguladores osmóticos sobre el crecimiento de estas especies, produciendo una disminución en el número de raíces y por consiguiente en el crecimiento. No obstante, cuando se combinan estos dos tratamientos, se obtiene el mayor número de raíces, este efecto pue-

deberse a una relación sinérgica entre el manitol y sorbitol, frente a los cuales esta especie responde generando gran cantidad de raíces. Este comportamiento también caracteriza al desarrollo longitudinal de la raíz.

Por otra parte, los resultados indican que la longitud del tallo posee valores estadísticamente diferentes entre sus tratamientos, siendo el T₂, quien retrasa de forma más eficiente el desarrollo de esta variable, y por ello es considerado una opción adecuada para la conservación *in vitro* de esta especie, al menos cuando se considera el desarrollo de la longitud del tallo a través del tiempo.

Estos resultados concuerdan con lo expuesto por Cárdenas y Villegas(10), quienes mencionan que el uso de manitol en el medio de cultivo genera mayor estrés sobre los explantes que el sorbitol y la sacarosa.

Con respecto a la formación de nudos nuevos en la especie *D. trifida*, se observó que la implementación individual de manitol y sorbitol provoca un efecto retardante en la aparición de estas estructuras, este fenómeno solo puede ser contrarrestado por el uso de las combinaciones sacarosa-sorbitol o manitol-sorbitol, este último tratamiento, genera un desarrollo considerable en esta variable, lo cual podría deberse a un efecto sinérgico entre los dos osmolitos.

En este sentido, los tratamientos T₁, T₅ y T₆, son considerados adecuados para garantizar la mayor tasa de recuperación del material vegetal, lo cual es un atributo necesario en el establecimiento de una metodología eficiente para la conservación *in vitro* de una especie.

Por otro lado, el uso de manitol y sorbitol de forma individual y la combinación de manitol con sacarosa, disminuyeron la producción de ápices en esta especie, con-

Tabla 7. Variables determinantes de los procesos de crecimiento y desarrollo en *D. trifida* a los 7 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Sup (%)	H. Exp(%)	L. Tallo	N. Nudos	N. Raíces	L. Raíz	N. ápices
T ₁	100,00 a*	94,17 a	7,95 a	10,40 a*	7,30bc	6,00 a	20,50 a
T ₂	80,00 a*	59,66 b*	2,03 e*	5,00 b	2,50 d*	0,74 c*	8,00 b*
T ₃	100,00 a*	76,62 ab*	2,93 bc	6,07 b	2,73 d*	3,06 b	10,53 b*
T ₄	92,86 a*	88,18 ab*	2,54 d	7,38 b	6,23 c	3,20 b	10,46 b*
T ₅	100,00 a*	69,96 b*	5,62 b	12,87 a*	11,07 ab	5,67 a	20,73 a
T ₆	88,89 a*	84,32 ab*	3,25 c	10,63 a*	11,88 a	5,79 a	18,00 a

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para p<0,05, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T₁: Sacarosa 3%

T₃: Sorbitol 2%

T₅: Sacarosa 1.5% + Sorbitol 2%

T₂: Manitol 1.5%

T₄: Sacarosa 1.5% + Manitol 1.5%

T₆: Manitol 1.5% + Sorbitol 2%

firmando su efectividad como reguladores osmóticos, gracias a lo cual, estos tratamientos permiten retrasar el crecimiento de *D. trifida*. No obstante, al combinar el manito y sorbitol se observó una producción de nudos elevada, posiblemente debida al efecto sinérgico entre estos dos osmoreguladores.

El manitol y el sorbitol de forma individual y la combinación de manitol con sacarosa tuvieron un efecto en la producción de ápices estadísticamente similares, mostrando una disminución en su formación durante la conservación *in vitro* de *D. trifida*, confirmando su efectividad como reguladores osmóticos, gracias a lo cual fue posible retrasar el crecimiento de esta especie.

Con relación al porcentaje de hojas expandidas, se observó que el tratamiento T₁, presentó los valores más altos, mientras que los tratamientos T₂ y T₅, obtuvieron los porcentajes más reducidos, es decir, estos osmoreguladores permiten retrasar el desarrollo de *D. trifida*, al menos para esta variable. Además, una vez más es posible apreciar el efecto de la combinación manitol-sorbitol como un factor que genera un desarrollo más acentuado en el crecimiento de los segmentos nodales.

De otro modo, al considerar las variables de crecimiento y desarrollo, fue posible observar que no hubo un efecto significativo en la secreción de compuestos fenólicos al medio de cultivo, debido a la presencia de carbón activado en el mismo. Asimismo, el uso de diferentes osmoreguladores no provocó la aparición de tejidos desorganizados (callo) en esta especie.

Sin embargo, con respecto al porcentaje de hojas expandidas se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, siendo el T₂, quien ocasionó la necrosis de un número altamente significati-

vo de hojas, lo cual implica que el uso de manitol como retardante del crecimiento, se considera inadecuado para esta especie, ya que el efecto que tiene sobre esta variable es devastador, lo cual acabará comprometiendo la viabilidad y supervivencia de los segmentos nodales cultivados bajo estas condiciones.

No obstante, el uso individual de sacarosa y sorbitol o su combinación, permiten conservar de mejor manera las estructuras fotosintéticas de la vitro planta, razón por la cual son considerados buenos tratamientos para garantizar un comportamiento adecuado en el desarrollo de esta variable.

En este sentido y con base a los análisis estadísticos realizados, es posible afirmar que el tratamiento T₃ (sorbitol), es el más apropiado para conservar la especie *D. trifida*, ya que bajo estas condiciones de cultivo, las variables de crecimiento y desarrollo obtuvieron valores reducidos en cuanto a longitud del tallo, número de raíces y ápices; además, este tratamiento se caracterizó por presentar un número de nudos adecuado para la regeneración de la especie y el menor porcentaje de senescencia foliar, lo cual permitirá incrementar significativamente los intervalos entre subcultivos, todo esto garantizando los mayores índices de supervivencia.

Por otra parte, un análisis general de los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, permite apreciar que los tratamientos elegidos para la conservación *in vitro* de las diferentes especies de ñame presentan altos porcentajes de supervivencia y muestras mínimas de deterioro, por lo cual, es posible inferir que el periodo de conservación puede extenderse por un tiempo superior a los 7 meses.

Tabla 8. Variables que determinan los procesos de envejecimiento y deterioro en *D. trifida* a los 7 meses de conservación *in vitro*.

Trat	Feno (%)	H. Muertas (%)	Callo (%)
T ₁	0,00 a*	3,19 bc*	10,00 a*
T ₂	0,00 a*	30,40 a	0,00 a*
T ₃	0,00 a*	1,11 c*	0,00 a*
T ₄	0,00 a*	10,96 ab	0,00 a*
T ₅	0,00 a*	2,26 bc*	0,00 a*
T ₆	12,50 a*	11,44 a	0,00 a*

Leyenda: porcentajes con letras distintas por columnas difieren significativamente para p<0,05, Donde (*): atributo deseable para la conservación *in vitro*.

T₁: Sacarosa 3%

T₃: Sorbitol 2%

T₅: Sacarosa 1.5% + Sorbitol 2%

T₂: Manitol 1.5%

T₄: Sacarosa 1.5% + Manitol 1.5%

T₆: Manitol 1.5% + Sorbitol 2%

CONCLUSIONES

Finalmente, es posible afirmar que las especies pertenecientes al género *Dioscorea* pueden ser conservadas de forma efectiva, por lo menos, durante un periodo de 7 meses, mediante el uso específico de distintos osmoreguladores en el medio de cultivo. En este sentido, la mejor forma de conservar vitroplantas a partir de segmentos uninodales de *D. alata* y *D. bulbifera* es mediante la inclusión de la combinación manitol-sorbitol en el medio de cultivo.

Asimismo, la especie *D. rotundata* obtiene los mejores resultados en su conservación *in vitro* al utilizar como osmoregulador el manitol de forma individual, mientras que la aplicación de sorbitol resulta ser ideal para resguardar el material vegetal perteneciente a la especie *D. trifida*.

Además, se debe tener en cuenta que el uso de los medios de cultivo mencionados anteriormente, reducen la tasa de crecimiento de las accesiones y garantizan un fenotipo caracterizado por presentar patrones normales de crecimiento en condiciones de almacenamiento *in vitro*, manteniendo un alto índice de supervivencia y viabilidad del material vegetal, con lo cual es posible asegurar su disponibilidad para los productores, fitomejoradores y consumidores a través del tiempo, permitiendo resguardar parte del acervo genético de los materiales existentes en la colección de ñame de la Universidad de Sucre.

Por otra parte, debido a que cada especie requiere ser conservada empleando diferentes reguladores osmóticos, es posible afirmar que el genotipo de las mismas juega un rol importante durante el proceso de conservación *in vitro*, por lo cual, la estrategia de preservación no debe ser generalizada, con lo cual es posible diseñar los estudios necesarios que permitan alcanzar los ajustes idóneos que requiera cada especie en particular, para garantizar el desarrollo de una estrategia de conservación mucho más efectiva.

No obstante, aunque cada especie posee requerimientos específicos para su conservación *in vitro*, mediante la metodología empleada en esta investigación, es posible asegurar que el uso de osmoreguladores tales como el manitol y sorbitol juegan un papel fundamental en la aplicación exitosa de esta estrategia, al momento de resguardar materiales vegetales pertenecientes al género *Dioscorea* en general.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thurston, D. Tropical Plant Diseases. Michigan: Editorial Universidad de Michigan. 1984.
2. Borges et al. Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon caraqueño (Dioscoreaceae). Rev. peru. biol, 2009; (16), 203-208.
3. Reina, Y. El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Editorial Banco de la república. 2012.
4. Kameswara, R. Advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of biotechnology, 2004; (16), 136-145.
5. Becheet, S. *In vitro* preservation of Globe artichoke germplasm. Plant Tissue Cult, 2007; (17), 1-9.
6. Neveen, A, et al. Mid-term Storage and Genetic Stability of Strawberry Tissue Cultures. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2008; (4), 505-511.
7. Iswari, D, et al. *In vitro* Conservation of Pummelo (*Citrus Maxima* (Burm.)Merr.) Cv. Srinonyon using osmoticum and retardant. Perhimpunan Hortikultura Indonesia, 2010; 53-69.
8. Tehrim, S y Sajid, G. *In vitro* establishment, conservation and its implications for grape germplasm biodiversity. Romanian Biotechnological Letters, 2011; (16), 6781-6789.
9. De Mendiburu, F. Manual rápido de uso de la librería agrícola. Editorial Universidad Nacional Agraria La Molina. 2012.
10. Cárdenas, M y Villegas, A. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. Revista Fitotecnia Mexicana, 2002; (25), 213-217.
11. Borges, M y Sosa, Y. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de carbón activado sobre la multiplicación *in vitro* de ñame. Biotecnología Vegetal, 2008; (8), 87-90.
12. Acedo, V y Arradoza, C. Development of *in vitro* slow growth culture for yam (*Dioscorea alata* L.). PCARRD, 2006; (30), 1-1.
13. Paez de Casares, J y Gonzales, R. Conservación *in vitro* de dos variedades de papa (*Solanum tuberosum* L.) bajo condiciones de crecimiento mínimo. Revista latinoamericana de la papa, 2001; (12), 121-129.
14. Brown, D, et al. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. PhysiologiaPlantarum, 1979; (46), 36-41.
15. Sawwan, J, et al. Phosphorus regulates osmotic potential and growth of African violet under *in vitro*-induced water deficit. Journal Plant Nutrition, 2000; (23), 759-771.