

CAPÍTULO 4

EFECTO DE LA SACAROSA Y MATRIZ DE CULTIVO SOBRE EL PROCESO DE MICROTUBERIZACIÓN EN *Dioscorea rotundanta* CULTIVAR BOTÓN

Oscar Elías Carmona Wilches³⁴
Lucía Candelaria Díaz Narváez³⁵
Heberto Polanco Ortega³⁶
Eder Dadner Durango Ballesteros³⁷
Javier Darío Beltrán Herrera³⁸
Isidro Elías Suárez Padrón³⁹

34Biólogo. Maestría en Biotecnología

35Biólogo. Maestría en Biotecnología

36Biólogo. Maestría en Biotecnología

37Ingeniero Agrónomo, Maestría en Biotecnología. Doctorado en Biotecnología Agrícola, mención Vegetal. Instructor Investigador en el SENA Programa SENNOVA.

38Biólogo, Maestría en Biología Molecular de Plantas Tropicales y Doctorado en Fitopatología. Profesor de la Universidad de Sucre.

39Ingeniero Agrónomo, Doctor en Ciencias Hortícolas. Docente Universidad de Córdoba

Introducción

El género *Dioscorea* está representado por al menos 650 especies (Thurston, 1998), de las cuales 11 son utilizadas como fuente de alimento en diferentes países tropicales y subtropicales del mundo, debido a sus tubérculos (ñame), los cuales son estructuras de almacenamiento con un alto contenido de almidón, vitamina C y otros nutrientes (Islam, Keller y Dembele, 2008; Ondo, Kevers y Dommes, 2009).

En Colombia, la especie *Dioscorea rotundata* (ñame espino) es cultivada principalmente por pequeños y medianos agricultores ubicados en los departamentos de Córdoba, Bolívar y Sucre (Reina, 2012). En este último, su cultivo ha sido priorizado como un renglón de importancia económica, debido a la gran cantidad de hectáreas sembradas, a la generación de empleo e ingresos que aporta a la economía local, así como a su alta demanda internacional, a través de su exportación hacia Estados Unidos, Puerto Rico y algunas islas del Caribe (Fundación Procaribe, 2012; Sánchez y Hernández, 1998).

No obstante, el desarrollo extensivo de este cultivo se ha visto limitado, principalmente por dos razones: (i) bajas tasas de multiplicación en campo del material vegetal de plantación (tubérculo), y (ii) alta susceptibilidad del cultivo frente a enfermedades causadas por virus, bacterias, nemátodos y en especial hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Reina, 2012; Salazar y Beltrán, 2002). Como alternativa, la propagación *in vitro* de ñame puede solucionar estos problemas, garantizando la calidad fisiológica y fitosanitaria del material de siembra del cultivo. En este sentido, la producción de tubérculos *in vitro* es considerada una estrategia alternativa y novedosa de propagación clonal, caracterizada por ofrecer un producto de fácil manejo, almacenamiento, transporte y factibilidad para la plantación mecanizada (Cabrera, 2009; Li et al., 2015; Ng, 1988).

No obstante, la microtuberización es un proceso complejo en el que intervienen factores como el genotipo, la concentración de sacarosa, el estado físico del medio de cultivo (sólido o líquido), el fotoperiodo, la concentración de macro elementos como el nitrógeno y los reguladores de crecimiento. (Balogun et al., 2006; Ng, 1988; Ondo, Kevers y Dommès, 2007; Yan, Yang y Li, 2011; Yu, Joyce, Cameron y McCown, 2000). Asimismo, se debe tener en cuenta que al inducir la formación de tubérculos *in vitro* en un medio libre de reguladores de crecimiento, es posible conocer la capacidad innata de un genotipo para producir microtubérculos, simplificando el proceso y evitando el efecto que ejercen estos mensajeros químicos sobre el periodo de dormancia del tubérculo (Dobránszki, Magyar y Hudák, 2008).

Teniendo en cuenta lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la sacarosa y el tipo de matriz de cultivo sobre el proceso de tuberización *in vitro* de la especie *D. rotundata* cultivar Botón en medios de cultivo libres de reguladores de crecimiento y su capacidad de brotación bajo condiciones de casa malla, con el fin de aprovechar las potencialidades de esta técnica para contribuir a garantizar la disponibilidad de material vegetal de siembra de excelente calidad fisiológica y fitosanitaria a los pequeños y medianos productores de ñame del departamento de Sucre a través de campos tan diversos como la conservación de germoplasma, el fitomejoramiento y la micropropagación.

Metodología

Las plantas necesarias para el desarrollo de esta investigación fueron obtenidas a través de subcultivos periódicos cada tres meses de la accesión codificada como 010 (*D. rotundata*, cultivar Botón) perteneciente al Banco de Germoplasma de Ñame de la Universidad de Sucre.

Fase 1: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio de cultivo sobre el proceso de tuberización *in vitro* en *D. rotundata* cultivar Botón

Se estableció una planta de 60 días de edad por frasco (182 cm³) con un volumen de 25 mL de medio de cultivo, el cual estuvo constituido por sales Murashige y Skoog 4,33 g L⁻¹, tiamina 1 mg L⁻¹ y mioinositol 0,1 g L⁻¹ con diferentes concentraciones de sacarosa (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70,

80 y 90 g L⁻¹) en matrices de cultivo sólidas (5,5 g L⁻¹ de agar) o líquidas (sin agar).

Los medios de cultivo se ajustaron a un pH de $5,8 \pm 0,1$ y fueron esterilizados por 20 minutos a 15 psi y 121°C, tras lo cual fueron observados durante 7 días, antes de su uso, para descartar cualquier contaminación, tras lo cual el establecimiento de las plantas se realizó bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar y se incubaron a una temperatura de 25 ± 5 °C, humedad relativa de 65% y una intensidad lumínica de 50 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Evaluación del proceso de microtuberización

Al cabo de 4 y 8 meses de haber iniciado la incubación de las plantas, se tomarón 8 de ellas al azar y fueron retiradas de los frascos para evaluarse las siguientes variables:

- Porcentaje de microtuberización: número de plantas que indujeron microtubérculos dividido por el número de plantas evaluadas y multiplicado por 100% (Balogun et al., 2006).

- Número de microtubérculos: número de microtubérculos producidos por una planta (Ng, 1988).

- Masa fresca promedio de los microtubérculos: Sumatoria de la masa fresca de los microtubérculos producido por una planta dividido por el número total de microtubérculos (Ondo, Kevers y Dommès, 2010).

Diseño y análisis estadístico.

El experimento se montó bajo un diseño completamente aleatorizado, conformado por 40 tratamientos (sacarosa 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 g L⁻¹; matriz de cultivo sólidas y líquidas, y tiempo de incubación 4 y 8 meses) y 8 réplicas por tratamiento. A las variables número y masa fresca promedio de los microtubérculos se les aplicó las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett), tras lo cual, se concluyó que las variables no se distribuyen de forma normal. Por lo tanto, se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney. Por otra parte, la variable porcentaje de tuberización se le aplicó una regresión logística y la prueba de Hosmer-Lemeshow. Todos los análisis estadísticos se procesaron en el programa R para Windows, versión 3.4.3

con los paquetes agricolae, pROC, DescTools y ResourceSelection (Andri, 2018; Mendiburu, 2016; R Core Team, 2017; Subhash, Jonah y Peter, 2017 y Xavier et al., 2011).

Fase 2: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio cultivo sobre el porcentaje de brotación de los microtubérculos

Al cabo de 8 meses de incubación bajo condiciones in vitro, los microtubérculos obtenidos en la fase anterior fueron cosechados, lavados con agua destilada y sembrados bajo condiciones de casa malla en bandejas plásticas con un sustrato constituido por tierra negra, bovinaza y arena en proporciones 1:1:1, con riego manual dos veces por semana. El experimento se montó bajo un diseño completamente aleatorizado, conformado por los microtubérculos obtenidos en cada uno de los 20 tratamientos evaluados (sacarosa 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 g L⁻¹ en matrices de cultivo sólidas y líquidas).

Evaluación del porcentaje de brotación de los microtubérculos.

Una vez transcurridos 5 meses de haber sembrado los microtubérculos se evaluó la siguiente variable:

Porcentaje de brotación: Número de microtubérculos brotados dividido por el número de microtubérculos totales y multiplicado por 100% (Cabrera et al., 2010).

Diseño y análisis estadístico.

El experimento se montó bajo un diseño completamente al azar con 20 tratamientos y 8 réplicas por tratamiento. La variable porcentaje de brotación se le aplicó una regresión logística y la prueba de Hosmer-Lemeshow. Todos los análisis estadísticos se procesaron en el programa R para Windows, versión 3.4.3 con los paquetes pROC, DescTools y ResourceSelection (Andri, 2018; R Core Team, 2017; Subhash et al., 2017 y Xavier et al., 2011).

Resultados y Discusión

Fase 1: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio de cultivo sobre el proceso de tuberización in vitro en *D. rotundata* cultivar Botón

Se evidenció que la formación de microtubérculos en *D. rotundata* cultivar Botón fue nula al cabo de 4 meses de incubación, independientemente de la concentración de sacarosa o matriz de medio de cultivo utilizada. Sin embargo, al cabo de 8 meses fue posible observar la formación de microtubérculos, por lo cual el tiempo de incubación de las plantas bajo condiciones in vitro influyó significativamente sobre el proceso de formación de microtubérculos en esta especie.

En contraste, Ng (1988) encontró que el tiempo de formación de los microtubérculos en diferentes variedades de la especie *D. rotundata* fue mucho menor (2 meses o menos) en matrices de cultivo sólidas. Resultados similares fueron reportados por Mbanaso, Chukwu y Opara (2007), quienes encontraron que en esta especie el cultivar Obiaoturugo al ser establecido en matrices de cultivo líquidas tiene la capacidad de producir microtubérculos de hasta 100 mg al cabo de 4 meses. Por consiguiente, es posible que el genotipo de los cultivares de *D. rotundata* influya significativamente sobre el tiempo de formación de los microtubérculos al igual que lo hace con las frecuencias de tuberización (Ng, 1988).

Por otra parte, se observó que todos los microtubérculos se formaron en la base de las yemas axilares ubicadas en la parte superior de las plantas, este comportamiento fue descrito como anormal por Ondo et al. (2007) y lo atribuyó al incremento de sacarosa en el medio de cultivo, la cual también es responsable de la formación de callo abundante alrededor de los nudos de la planta.

En este sentido, los resultados arrojados por esta investigación mostraron que, al establecer plantas de *D. rotundata* en matrices de cultivo líquidas en presencia de sacarosa, algunas de las yemas axilares en contacto con el medio de cultivo se hincharon (15 días o menos) y al cabo de 4 meses se caracterizaron por estar unidas a callo y poseer muchas raíces, tal y como lo indicó Ng (1988).

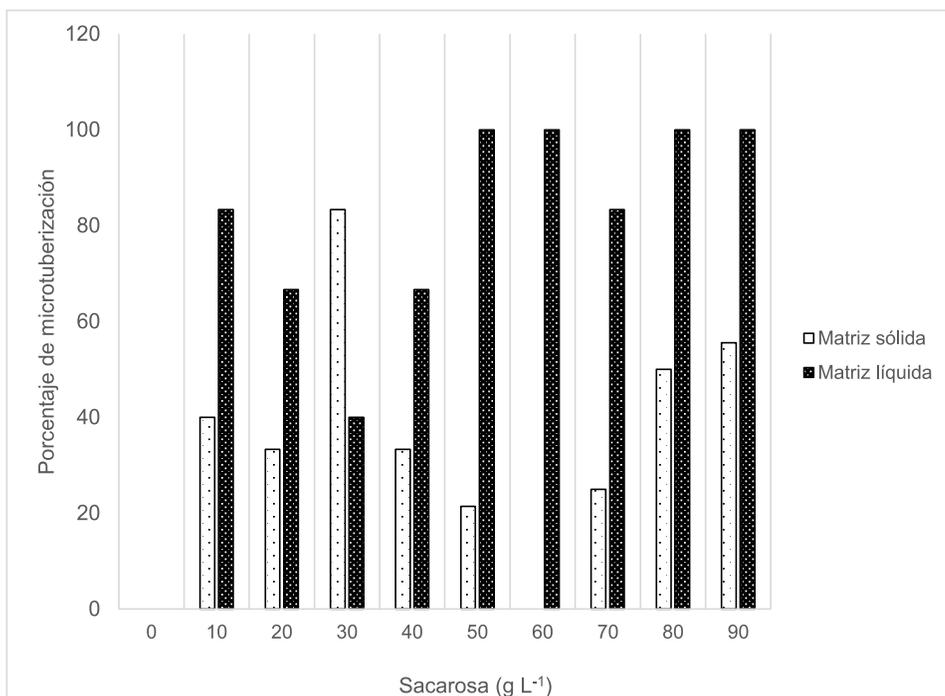


Figura 2. Efecto de la sacarosa y el tipo de matriz de cultivo sobre la formación de microtubérculos en *D. rotundata* cultivar Botón.

Adicionalmente, en esta investigación se encontró que en *D. rotundata* cultivar Botón la formación de microtubérculos puede ocurrir en medios de cultivo líquidos y sólidos suplementados con sacarosa en concentraciones que varían de 10 a 90 g L⁻¹ sin necesidad de adicionar reguladores de crecimiento al mismo (figura1), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Mbanaso et al. (2007) y Ondo et al., (2007). Además, la regresión logística realizada demostró que la probabilidad de tuberización de las plantas de *D. rotundata* cultivar Botón están asociadas al tipo de matriz de cultivo utilizada. En este sentido, al emplear matrices de cultivo líquidas la probabilidad de tuberización de las plantas es significativamente superior a los resultados observados en matrices de cultivo sólidas.

Asimismo, fue posible determinar que la concentración de sacarosa está asociada a la probabilidad de formar microtubérculos en matrices de cultivo líquidas en *D. rotundata* cultivar Botón, es decir, que a medida que aumenta la concentración de sacarosa bajo estas condiciones la probabilidad de formar microtubérculos en esta especie se incrementa. En consecuencia, el porcentaje de tuberización en *D. rotundata* cultivar Botón fue superior

en matrices de cultivo líquida, especialmente al suplementar el medio de cultivo con 50, 60, 80 o 90 g L⁻¹ de sacarosa, con lo cual fue posible inducir el máximo porcentaje de tuberización in vitro (figura 1).

Número y masa fresca promedio de los microtubérculos producidos por planta

Al cabo de 8 meses de incubación bajo condiciones in vitro de *D. rotundata* cultivar Botón se encontró que la concentración de sacarosa influyó significativamente sobre el número y masa fresca promedio de microtubérculos por planta, independientemente del tipo de matriz de cultivo utilizada (Tabla 1). Confirmando así, lo expresado por Yu et al. (2000), quienes consideran a la sacarosa como el factor más importante en el proceso de microtuberización.

No obstante, pese a la importancia de este factor, su mecanismo de acción para inducir la formación de microtubérculos no se conoce en detalle (Ondo et al., 2007), sin embargo, Jo, Tewari, Hahn y Paek (2009) sugieren que la sacarosa puede constituir un regulador osmótico esencial durante el proceso, así como una fuente de energía, la cual en concentraciones adecuadas podría actuar como una señal para la formación de los microtubérculos.

Por otro lado, se observó que el número y masa fresca promedio de los microtubérculos de esta especie en matrices de cultivo líquida presentó valores estadísticamente iguales o superiores a los presentados en matrices sólidas para cada una de las concentraciones de sacarosa utilizadas (Tabla 1). En este sentido, es posible que estos resultados se deban a que las matrices de cultivo líquidas poseen características que favorecen el proceso de microtuberización tales como: I) incrementar la disponibilidad de agua y nutrientes disueltos en el medio de cultivo (Singha 1982, citado por Avila, Pereyre y Argüello, 1996; Debergh, 1983), II) reducir los gradientes de nutrientes y hormonas endógenas (Gawel y Robacker 1990), III) eliminar la polaridad y IV) disminuir el efecto de las toxinas sobre el tejido vegetal (Ascough y Fennell, 2004).

En consecuencia, el mayor número de microtubérculos producidos por planta en matrices de cultivo líquidas se obtuvo al utilizar 80 g L⁻¹ de sacarosa, este valor no presentó diferencias estadísticamente significativas con los obtenidos al emplear 70, 60, 50 o 20 g L⁻¹ de la misma, pero si con el resto de niveles azúcar, asimismo se encontró que el número de microtubérculos producidos bajo estas condiciones por las plantas fue

significativamente superior a los obtenidos en matrices de cultivo sólidas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la sacarosa en matrices de cultivo sólidas y líquidas sobre el número y masa fresca de los microtubérculos en *D. rotundata* cultivar Botón.

Sacarosa (mg L ⁻¹)	Número de microtubérculos promedio por planta		Masa fresca promedio de los microtubérculos por planta en mg	
	Matriz Sólida	Matriz Líquida	Matriz Sólida	Matriz Líquida
0	0,00 DE a	0 E a	0,00 C a	0,00 E a
10	0,4 BC b	1,17 CD a	17,85 B b	64,13 CD a
20	0,33 BCDE b	2,33 ABC a	7,77 BC b	66,60 CD a
30	0,83 A a	0,80 DE a	29,68 A a	18,16 DE a
40	0,42 BCD b	1,50 CD a	27,86 B b	155,60 BC a
50	0,21 CDE b	2,3 ABC a	18,82 BC b	258,31 A a
60	0,00 E b	3,33 AB a	0,00 C b	117,43 BC a
70	0,25 BCDE b	3,67 AB a	6,81 BC b	130,07 BC a
80	0,9 ABC b	3,67 A a	16,38 AB b	104,27 BC a
90	1,4 AB a	2,17 BCD a	4,91 B b	245,50 AB a

Letras mayúsculas representan diferencias significativas entre los niveles de sacarosa para cada matriz según prueba de Kruskal-Wallis para $p < 0,05$, y letras minúsculas representan diferencias significativas entre matrices para cada nivel de azúcar según prueba de Mann-Whitney para $p < 0,05$.

Por otro lado, la mayor masa fresca promedio (258,31 mg) de microtubérculos producidos por planta en matrices de cultivo líquidas se obtuvo al utilizar 50 g L⁻¹ de sacarosa, este valor no presentó diferencias estadísticamente significativas con el obtenido al emplear 90 g L⁻¹ de sacarosa (figura 2), pero si con el resto de niveles azúcar, de igual forma también se encontró que la masa fresca de los microtubérculos producidos bajo estas condiciones por las plantas fue significativamente superior a los obtenidos en matrices de cultivo sólidas (Tabla 1).

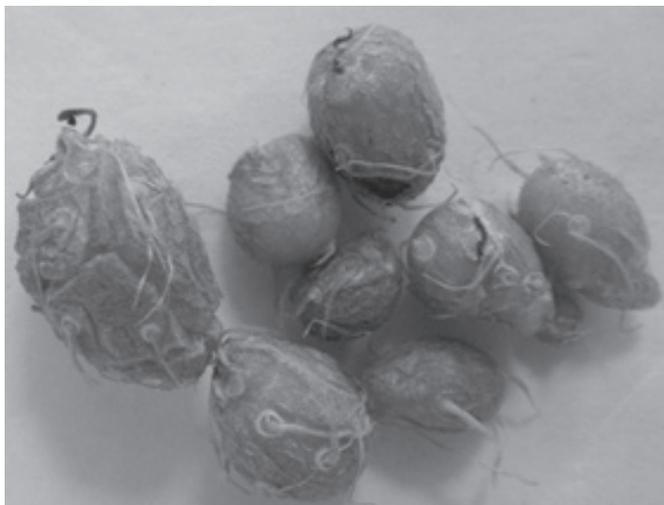


Figura 3. Microtubérculos producidos por plantas de *D. rotundata* cultivar Botón en matrices de cultivo líquidas suplementadas con 90 g L^{-1} de sacarosa.

Fase 2: Evaluación del efecto de la sacarosa y el tipo de matriz del medio cultivo sobre el porcentaje de brotación de los microtubérculos

Porcentaje de brotación de los microtubérculos bajo condiciones de casa malla.

En este experimento se observó que el porcentaje de brotación de los microtubérculos de *D. rotundata* cultivar Botón obtenidos en matrices de cultivo sólidas fue cero, independientemente de la concentración de sacarosa utilizada (figura 3). Sin embargo, los microtubérculos obtenidos en matrices de cultivo líquidas suplementadas con 40, 50, 60, 70, 80 o 90 g L^{-1} de sacarosa brotaron y dieron lugar a plantas bajo condiciones de casa malla (figura 3).

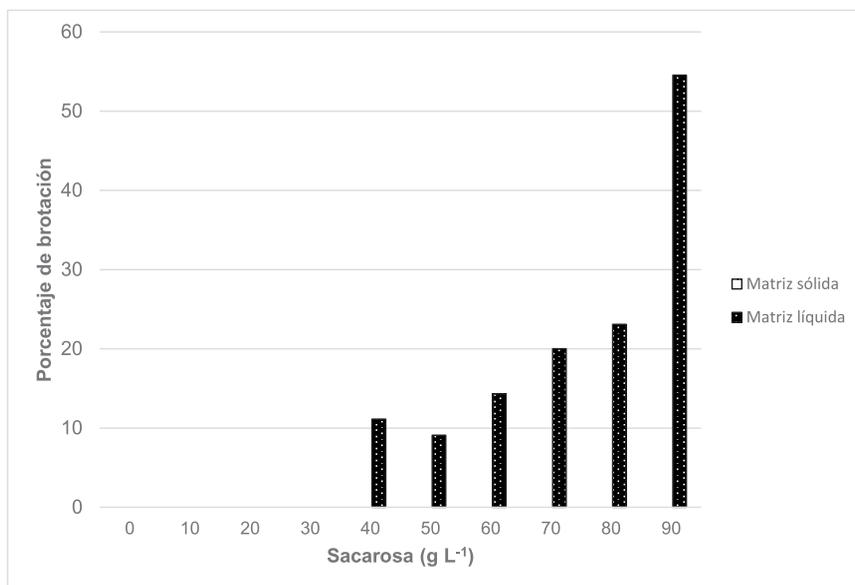


Figura 3. Efecto de la sacarosa y el tipo de matriz de cultivo sobre el porcentaje de brotación de los microtubérculos en *D. rotundata* cultivar Botón.

Adicionalmente, la regresión logística realizada mostró que la probabilidad de brotación de un microtubérculo tiende a ser mayor si la planta que lo produjo se incubó en matrices de cultivo líquidas con respecto a los resultados obtenidos en matrices sólidas. Asimismo, se encontró que la concentración de sacarosa empleada en el medio de cultivo influyó significativamente sobre la probabilidad que tiene un microtubérculo de brotar, en consecuencia, a mayor concentración de sacarosa, mayor es la probabilidad de brotación.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Coleman, Donnelly y Coleman (2001), quienes afirman que el porcentaje de brotación de los microtubérculos se ve influenciado por las condiciones bajo las cuales fueron producidos, especialmente por la concentración de sacarosa empleada en el medio de cultivo, ya que es posible que los microtubérculos producidos en medios de cultivo con altas concentraciones de sacarosa podrían acumular mayor cantidad de reservas como el almidón, el cual podría ser movilizado durante el proceso de brotación de los microtubérculos para sustentar el posterior crecimiento y desarrollo de sus brotes, explicando así de forma parcial el mayor porcentaje de brotación observado en tubérculos producidos in vitro en matrices de cultivo líquidas con concentraciones de sacarosa entre 40 y 90 g L⁻¹ (Ondo et al., 2009; Naik y Karihaloo, 2007).

Asimismo, se debe tener en cuenta que la cantidad de reservas de un microtubérculo (almidón) está muy relacionada con su masa fresca y por tanto con la capacidad de brotación del mismo, frente a lo cual Cabrera et al. (2010) han reportado que la masa fresca de un microtubérculo influye significativamente sobre su porcentaje brotación, de forma tal que microtubérculos con una masa igual o superior a 3 g tienen un porcentaje de brotación significativamente superior a los obtenidos por microtubérculos con una masa fresca entre 0,5 y 0,9 g.

Por consiguiente, es posible que la falta de brotación de los microtubérculos producidos en matrices de cultivo sólida (figura 3) se deba a la baja masa fresca de los microtubérculos (menor a 0,1 g), los cuales no disponen de la cantidad suficiente de sustancias de reserva para dar lugar al proceso de brotación. En contraste, al aprovechar las ventajas de incubar las plantas en matrices de cultivo líquidas, tal como lo es mejorar la disponibilidad de agua y nutrientes (Singha 1982, citado por Ávila et al., 1996; Debergh, 1983), fue posible obtener microtubérculos con una mayor cantidad de reservas que les permitieron sustentar el proceso de brotación una vez sembrados bajo condiciones de casa malla, especialmente cuando la incubación de la plantas bajo condiciones in vitro se realizó en medios de cultivo suplementados con 90 g L⁻¹ de sacarosa (figura 4).



Figura 4. Planta de *D. rotundata* cultivar Botón obtenida bajo condiciones de casa malla a partir de microtubérculos producidos en matrices de cultivo líquidas suplementadas con 90 g L⁻¹ de sacarosa.

Conclusiones

La especie *D. rotundata* cultivar Botón tiene la capacidad de formar tubérculos bajo condiciones in vitro en medios de cultivo libres de reguladores de crecimiento. Durante este proceso, la concentración de sacarosa y el tipo de matriz de cultivo influyen sobre el porcentaje de formación, número, masa fresca y porcentaje de brotación de los microtubérculos, por lo cual se recomienda incubar plantas de 60 días de edad en matrices de cultivo líquidas suplementadas con 90 g L⁻¹ de sacarosa durante 8 meses para favorecer la formación de microtubérculos con la capacidad de brotar y formar plantas bajo condiciones de casa malla.

Referencias Bibliográficas

- Andri, S. (2018). DescTools: Tools for descriptive statistics. R package version 0.99.24.
- Ascough, G., y Fennell, C. (2004). The regulation of plant growth and development in liquid culture. *S. Afr. J. Bot*, 70(2), 181-190.
- Avila, A., Pereyre, S. y Argüello, J. (1996). Potato micropropagation: Growth of cultivars in solid and liquid media. *Am. J. Potato Res*, 39(1), 253-258.
- Balogun, M., Fawole, L., SYC, N., NQ, N., Shiwachi, H., y Kikuno, H. (2006). Interactions among cultural factors in microtuberization of white yam *Dioscorea rotundata*). *Tropical Science*, 46(1): 55-59.
- Cabrera, M. (2009). Empleo de métodos biotecnológicos para la propagación de ñame. *Bioteología Vegetal*, 9(4), 195-209.
- Cabrera, M., Gómez, R., Rayas, A., De Feria, M., López, J., Medero, V., Basail, M., Rodríguez, G., y Santos, A. (2010). Evaluación en campo de plantas de ñame (*Dioscorea alata* L.) obtenidas de los microtubérculos formados en Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 12(1), 47-56.
- Coleman, W., Donnelly, D., y Coleman, S. (2001). Potato Microtubers as Research Tools: A Review. *American Journal of Potato Research*, 78(1), 47-55.
- Debergh, P. (1983). Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. *Physiol. Plant*, 59(1), 270-576.

- Dobránszki, J., Magyar, K., y Hudák, I. (2008). In vitro tuberization in hormone-free systems on solidified medium and dormancy of potato microtubers. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 2(1), 82-94.
- Fundación procaribe. (2012). Guía práctica para el manejo orgánico de cultivo de ñame tipo exportación. Recuperado de https://issuu.com/swissaid-ko/docs/cartilla_ame_julio_2012
- Gawel, N. y Robacker, C. (1990). Somatic embryogenesis in two *Gossypium hirsutum* genotypes on semisolid versus liquid proliferation media. *Plant. Cell. Tissue. Org. Cult*, 23(1), 201-204.
- Islam, M., Keller, E., y Dembele, D. (2008). Effects of Growth Regulators on In vitro Propagation and Tuberization of Four *Dioscorea* Species. *Plant Tissue Culture And Biotechnology*, 18(1), 25-35.
- Jo, E., Tewari, R., Hahn, E., y Paek, K. (2009) In vitro sucrose concentration affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96(1), 307-315.
- Li, M., Li, J., Wang, Y., Liu, W., Guo, X., Li, S., Han, L., Song, Z., Zhao, X., y Yang, Q. (2015). A simple method for microtuber production in *Dioscorea opposita* using single nodal segments. *Pak. Journal of Botany*, 47(2), 665-668.
- Mbanaso, E., Chukwu, L., y Opara, M. (2007). In vitro basal and nodal microtuberization in yam shoot cultures (*Dioscorea rotundata* poir, cv. Obiaoturugo) under nutritional stress conditions. *African Journal of Biotechnology*, 6(21), 2444-2446.
- Mendiburu, F. (2016). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-4. <http://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Naik, P., y Karihaloo, J. (2007). Micropropagation for Production of Quality Potato Seed in Asia-Pacific. New Delhi: Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology. 54 p.
- Ng, S. (1988). In vitro tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 14(1), 121-128.
- Ondo, P., Kevers, C., y Dommes, J. (2007). Axillary proliferation and tuberisation of *Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(1), 107-114.

- Ondo, P., Kevers, C., y Dommes, J. (2009). Effects of reducing sugar concentration on in vitro tuber formation and sprouting in yam (*Dioscorea cayenensis*–*D. rotundata* complex). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 99(1), 55-59.
- Ondo, P., Kevers, C., y Dommes, J. (2010). 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.
- R core team. (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Reina, Y. (2012). Documentos sobre economía regional: El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Banco de la República, Cartagena.
- Salazar, R., y Beltrán, J. (2002). Microtuberización en Ñame (*Dioscorea alata* L.) var. “Pico de Botella”. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(2), 27-32.
- Sánchez, C., y Hernández, L. (1998). Descripción de aspectos productivos de postcosecha y de comercialización del ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar.
- Subhash, R., Jonah, L., y Peter, Solymos. (2017). ResourceSelection: Resource Selection (Probability) Functions for Use-Availability Data. R package version 0.3-2.
- Thurston, D. (1998). *Tropical plant diseases*. New York, Estados Unidos de America: The American Phytopathological Society.
- Xavier, R., Natacha, T., Alexandre, H., Natalia, T., Frédérique, L., Jean-Charles, S. y Markus, Müller. (2011). pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12, p. 77.
- 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*, 104(1), 193-198.
- Yu, W., Joyce, P., Cameron, D., y McCown, B. (2000). Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Reports*, 19(1), 407-413.