

RESPUESTA DE TEJIDOS EMBRIOGENICOS DE ÑAME (*Dioscorea alata* var. "Pico de botella") A *Colletotrichum gloeosporioides*

RESPONSE OF YAM (*Dioscorea alata* var. "Pico de botella") EMBRYOGENIC TISSUES TO *Colletotrichum gloeosporioides* FILTRATE

José A. Salgado¹; Isidro E. Suárez¹

Recibido para publicación: Noviembre 17 de 2011 - Aceptado para publicación: Marzo 23 de 2012

RESUMEN

La producción y exportación de ñame se han visto afectadas negativamente en las últimas décadas como consecuencia de la incidencia de antracnosis, la cual se ha manejado con genotipos con algún grado de resistencia, sin alcanzar un manejo eficiente de está. Con el fin de contribuir en el mejoramiento genético del *Dioscorea alata* se evaluó la respuesta de cultivos embriogénicos de ñame al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y a su filtrado. Cultivos embriogénicos fueron inducidos a partir de explantes foliares de la variedad "Pico de botella" en presencia de 2,4-D. Las masas proembriogénicas (MPe) obtenidas fueron multiplicadas y posteriormente expuestas a diferentes concentraciones del filtrado, al igual que establecidas en forma de un cultivo dual entre éstas y una muestra de micelio del hongo. Ambos experimentos evidenciaron un alto grado de susceptibilidad de los tejidos inducidos a la presencia del hongo.

Palabras clave: antracnosis, *Dioscorea*, selección *in vitro*, filtrado.

ABSTRACT

Yam tuber production has been affected for anthracnose, decreasing farmers' incomes. Genetic resistance has been attempted; however, the species narrow genetic base favors fungal re-infection. Selection of new cultivars is hampered by low flowering and seed setting. The ability of embryogenic cultures to generate *in vitro* resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* by co-culturing proembryogenic masses (PEMs) with several concentrations of the fungal filtrate was evaluated. PEMs were induced from "Pico de botella" var. foliar explants on MS supplied with 2,4-D. Proliferated PEMs were challenged with several concentrations of the culture filtrate and dually cultured with fungal mycelia. PEMs showed susceptibility to fungal filtrate and mycelia. No embryos were recovered from challenged or filtrate-free PEMs.

Key works: anthracnose, *Dioscorea*, *in vitro* selection, culture filtrate.

¹Universidad de Córdoba, Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural, Carrera 6 No. 76-103, Montería-Colombia, Tel: (4) 790 8023, Fax: (4) 786 0255. *Email: isidrosuarez@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El tubérculo de ñame (*Dioscorea* spp) constituye una de las principales fuentes alimenticias de muchas poblaciones en las regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. En la Costa Atlántica Colombiana es una de las mayores actividades agrícolas de pequeños y medianos campesinos quienes lo cultivan para consumo y abastecimiento de los mercados locales, representando hasta un 92% de la producción nacional, está última alcanzó un área sembrada de 24.000 Ha en 2005, generando alrededor de 16.000 puestos de trabajo (Pérez et al. 2011; DANE 2011).

En el cultivo de ñame, las enfermedades constituyen la mayor limitante productiva, siendo la antracnosis la más importante llegando a ocasionar pérdidas que superan el 85% (Green 1994; Bustamante y Buitrago 2006; Amusa 2006). El uso de mejoramiento genético tradicional con estrategia para contrarrestar el problema tiene limitaciones por el largo tiempo relativo que implica la consecución de variedades mejoradas y la biología floral de la planta, que en nuestro medio florece muy raramente y por consiguiente la producción de semillas es prácticamente nula. Debido a esto, la aplicación de técnicas biotecnológicas que permitan la selección de materiales utilizando técnicas no convencionales de mejoramiento, como la variación somaclonal, la selección *in vitro* y la transformación genética, pueden aportar avances significativos en la superación de las limitantes del cultivo (Chamandoosti 2009).

La selección de tejidos embriogénicos resistentes a filtrados de hongos fitopatógenos ha sido utilizada como una estrategia de mejoramiento

genético no convencional en diversas especies de importancia económica (*Mangifera indica*, *Vitis vinífera*, *Solanum betacea*, *Pisum sativum* y *Triticum aestivum*, entre otras), y goza de gran aceptación entre los consumidores, debido a que la característica adquirida por las plantas sometidas a la presión de selección se obtiene por mecanismos inherentes a la genética y fisiología del material de origen (Jayasankar y Litz 1998; Jayasankar et al. 2000; Švábova & Lebeda 2005; Patiño et al. 2007). El objetivo del presente trabajo fue evaluar la respuesta de cultivos embriogénicos de ñame expuestos a un filtrado de *Colletotrichum gloeosporioides* con miras a seleccionar líneas embriogénicas resistentes a dicho hongo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal e inducción de tejidos embriogénicos

Los explantes fueron tomados de plantas de ñame var. "Pico de botella", cultivadas en condiciones *in vitro* durante dos meses después del último subcultivo. Los explantes consistieron en hojas con peciolo, las cuales fueron establecidas sobre medio 100% MS semisólido suplementado con cuatro concentraciones de 2,4-D (0,0; 1,0; 1,5 y 2,0 mg L⁻¹) evaluándose 10 repeticiones por tratamiento, para un total de 40 unidades experimentales. El pH del medio fue ajustado a 5,7-5,8 previo a la adición de agar y luego esterilizado a 121 °C y 1,1 kg cm⁻² por 15 minutos. Los explantes establecidos en cada tratamiento fueron almacenados a una temperatura de 22 °C ± 2 °C en condiciones de oscuridad por cuatro semanas, al final de las cuales se determinó el porcentaje de inducción de tejido y el tipo de tejido inducido sobre los explantes.

Multiplicación de tejido embriogénico

Porciones de tejido embriogénico de ñame fueron establecidos en medios de cultivo con diferente consistencia (semisólido y líquido) con el fin de evaluar el incremento de masa fresca o volumen, respectivamente. Las evaluaciones de incremento de masa fresca se realizaron sobre porciones de tejido embriogénico de aproximadamente 160 mg de peso establecidas en cajas de Petri conteniendo medio Morashige y Skoog MS con formulación similar a la fase de inducción, adicionado con 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D y solidificado con 8.000 mg L⁻¹ de TC-agar (Sigma®). Un total de 16 unidades experimentales fueron evaluadas, realizándose pesajes de los tejidos cada cinco semanas. Posteriormente, con el fin de evaluar la multiplicación de masas proembriogénicas (MPEs) de ñame en medio semisólido o líquido, se transfirieron porciones de tejido embriogénico de aproximadamente 600 mg a medios de cultivo MS o MS3:1N (Morashige y Skoog modificado por Witjaksono y Litz 1999), suplementados con 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D, evaluando 12 unidades experimentales por cada formulación de medio de cultivo. Al momento de la transferencia, las MPEs fueron pesadas y establecidas en cajas de Petri (90 x 20 mm) conteniendo aproximadamente 20 ml de medio; posteriormente, las cajas fueron almacenadas en condiciones de oscuridad. Después de cuatro semanas de cultivo se realizó un nuevo pesaje con el fin de determinar el incremento de peso fresco de las mismas. Para los tejidos cultivados en medio líquido, las evaluaciones de incremento de volumen se realizaron sobre porciones de tejido embriogénico de ñame, con un volumen inicial de aproximadamente 0,4 ml de volumen decantado, cultivadas en Erlenmeyers con

capacidad de 125 cc conteniendo 35 ml de medio MS3:1N líquido suplementados con 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D. Los cultivos fueron mantenidos en agitación constante a 121 rpm, bajo condiciones de semioscuridad y la medición se realizó por un periodo de 15 semanas, utilizando tubos Eppendorf® de 2 ml de capacidad. Se realizaron transferencias a medio fresco cada 5 semanas de cultivo, registrándose el incremento de volumen en cada caso.

En todos los casos el pH del medio fue ajustado a 5,8 y esterilizado a 121 °C y 1,1 kg cm⁻² por 15 minutos, previo al establecimiento del experimento y los cultivos mantenidos en cuarto de crecimiento a 22 ± 2°C.

Obtención del filtrado

El filtrado utilizado en la presente investigación fue obtenido a partir del cultivo de un aislado purificado y cultivado en el Laboratorio de Fitopatología de la Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. El patógeno fue cultivado en Agar Papa-Dextrosa (PDA) hasta esporulación. Las esporas del hongo fueron suspendidas en agua estéril hasta obtener una densidad aproximada de 10.000 esporas ml⁻¹ (Jayasankar y Litz 1998; Jayasankar et al. 2000). Una dilución de aproximadamente 100 esporas ml⁻¹, fue inoculada en Erlenmeyers conteniendo 50 ml de medio Czapek Dox, los cuales fueron cubiertos con papel aluminio, sellados con Parafilm® y cultivados en un agitador orbital en la oscuridad. Después de tres semanas de cultivo, el contenido total del Erlenmeyer fue vertido a través de papel filtro Whatman N° 1 y el filtrado líquido colectado. Posteriormente, se esterilizó mediante filtración previamente a su adición en el medio

de cultivo, estableciéndose un experimento de cuatro tratamientos con cuatro repeticiones cada uno.

Cocultivo con filtrados de *Colletotrichum gloeosporioides*

Aproximadamente 500 mg de MPEs fueron inoculadas en medio de cultivo MS3:1N suplementado con 2,0 mgL⁻¹ de 2,4-D y conteniendo 20, 40 o 60 % (v/v) del filtrado del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Para hacer la debida comparación se utilizó un tratamiento control sin filtrado. Las MPEs fueron cultivadas en medio MS3:1N con 2,0 mg L⁻¹ de 2,4-D y mantenidas en condiciones similares a las del estado de multiplicación con transferencias cada tres semanas a medio fresco combinado con el filtrado del hongo. Luego de nueve semanas sucesivas de cultivo, con subcultivos cada tres semanas a medios de cultivo fresco, se determinó la variación en volumen de los tejidos, depositando la totalidad del contenido del cultivo en una probeta graduada y midiendo el volumen de los tejidos decantados.

Cultivo Dual

Aproximadamente 300 mg de MPEs obtenidas de la selección *in vitro*, y tejidos cultivados sin la presencia del filtrado del hongo, fueron colocados en puntos opuestos dentro de cajas de Petri conteniendo medio de cultivo semisólido similar al utilizado durante la selección *in vitro* y bajo las mismas condiciones ambientales indicadas para esta fase; en el centro de la caja de Petri, en forma equidistante de las dos muestras de tejidos embriogénicos, se colocó una muestra de micelio de un cultivo del hongo en crecimiento (8 mm diámetro). La caja fue cerrada, sellada con Cristaflex® y colocada

en condiciones de oscuridad para favorecer el crecimiento del micelio. El crecimiento diametral del micelio del hongo con respecto a la posición de las muestras de MPEs dentro de la caja fue registrado y fotografiado diariamente durante 21 días.

Formación de embriones somáticos

Porciones de MPEs seleccionadas y no seleccionadas en presencia del filtrado del hongo fueron transferidas a medio semisólido MS y MS3:1N, sin suministro de reguladores de crecimiento, con el fin de inducir la formación de embriones somáticos. Se evaluó el efecto de la adición de dos concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo (30 y 45 g L⁻¹) sobre el número y las características de los embriones somáticos formados. Los cultivos fueron establecidos en cajas de Petri (90 x 20 mm), las cuales fueron selladas con Nescofilm® y almacenadas en condiciones de oscuridad a una temperatura de 20 °C.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se distribuyeron con un diseño completamente al azar con un mínimo de 10 repeticiones por cada tratamiento. Los datos colectados fueron tabulados en Microsoft Excel®, analizados con ANAVA ($\alpha = 0,05$) utilizando el programa de análisis estadístico SAS® v. 9.1 y graficados utilizando el programa SigmaPlot® v. 10.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de tejido embriogénico

Un 100% de inducción de tejidos embriogénicos fue observado en todos los tratamientos que contenían alguna concentración de 2,4-D, mientras que en el tratamiento control no se

observó inducción. Los tejidos crecieron de forma abundante, con apariencia mucilaginoso y coloración blanco opaco (Figura 1). Estos resultados concuerdan con los reportados por Torres (2007), quien obtuvo inducción de tejido embriogénico en medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D a concentraciones de 1,0 y 2,0 mg L⁻¹, utilizando explantes foliares de *Dioscorea rotundata*, indicando que la adición de dicho regulador de crecimiento vegetal (RCV) es necesaria para la inducción de MPEs en explantes foliares de ñame.

No obstante la similitud de los resultados, los explantes utilizados por Torres (2007) respondieron a la inducción luego de dos semanas posteriores al establecimiento, mientras que en nuestro caso, el tejido inducido se evidenció a las seis semanas. Adicionalmente, el tejido embriogénico se indujo en la zona donde la lámina foliar y el peciolo se unen caso contrario al trabajo anteriormente citado, donde la inducción se dio a nivel de la parte terminal del peciolo, donde éste se conecta con el tallo de la planta.

Las diferencias entre los resultados obtenidos por Torres (2007) y los reportados en el presente trabajo pueden deberse principalmente a efectos genotípicos, ya que el tipo de explante y las condiciones de cultivo fueron bastante similares, variando únicamente los genotipos utilizados en cada trabajo. Deo et al. (2010) indican que entre cultivares de una misma especie se pueden presentar diferencias en cuanto a la inducción de tejidos embriogénicos, de esta forma, algunos genotipos son inducidos con relativa facilidad mientras que otros no presentan respuesta favorable bajo las mismas condiciones de cultivo, en cuyo caso deben modificarse las condiciones de cultivo o la composición del medio, hecho que ya había sido documentado por Oláh et al. (2009) quienes evidenciaron diferencias en la inducción de tejido embriogénico en varios cultivares de uva, demostrando que el genotipo del material vegetal responde selectivamente a la composición del medio de cultivo. Por su parte, Mozsár y Viczián (1996) señalan la gran influencia que tiene el genotipo sobre la respuesta de los tejidos cultivados *in vitro*,

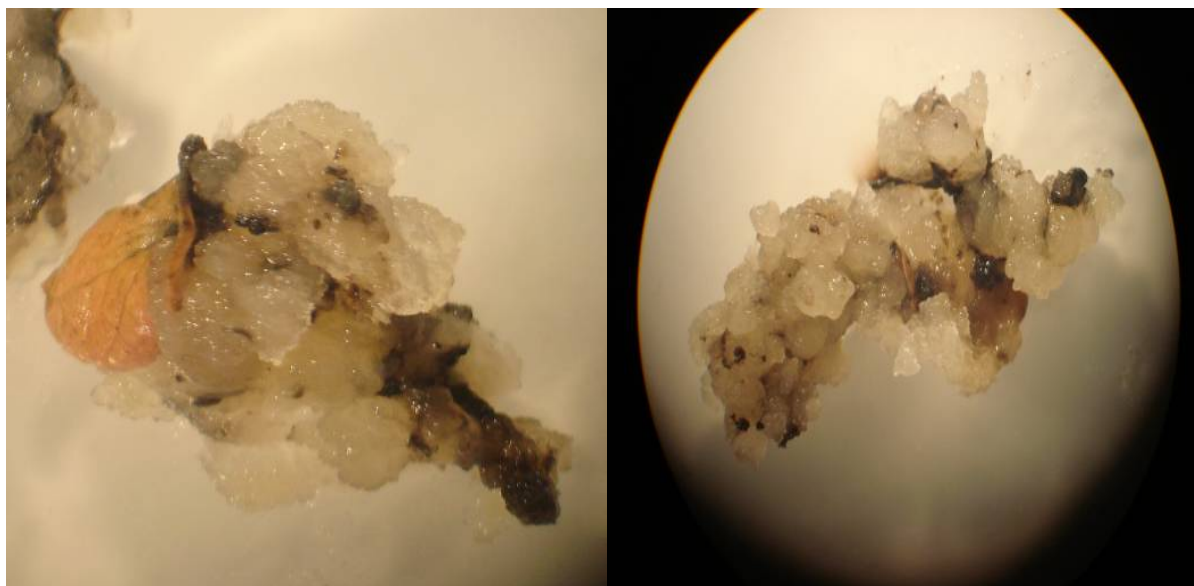


Figura 1. Masas proembriogénicas inducidas a partir de explantes foliares de *Dioscorea alata* var. Pico botella.

resaltando que genotipos bastante cercanos pueden, en algunos casos, responder de manera diferente, mientras que genotipos poco cercanos responden de manera similar.

La respuesta de un explante ante la estimulación *in vitro* puede diferir considerablemente de la de otro atendiendo al estado fisiológico del mismo al momento de la inducción y al genotipo de la planta madre, por lo que la elección de ambos (explante y genotipo) es generalmente crucial en la obtención de una respuesta embriogénica, dependiendo en mayor grado del genotipo. Complementariamente, se indica que la inducción embriogénica puede deberse también a múltiples factores (RCVs, alta concentración de sacarosa y estrés osmótico) por lo que la respuesta embriogénica no puede ser atribuida a un solo factor (Kaoy Michayluk 1980, Gray 1996, Fehér et al. 2003).

Multiplicación de tejido embriogénico

La figura 2 muestra el incremento de peso fresco después de cuatro semanas de cultivo

de las MPEs establecidas en medios de cultivo semisólido MS o MS 3:1N suplementados con 2.0 mg L⁻¹ de 2,4-D. El análisis estadístico de los datos permitió inferir que no existieron diferencias significativas entre las tasas de multiplicación como resultado de los medios utilizados ($P=0,171$). Mientras que en los tejidos cultivados en medio líquido se observó un incremento en el volumen de las MPEs, aunque estos perdieron potencial de multiplicación a medida que fueron subcultivados.

Torres (2007) evidenció incremento considerable de volumen en MPEs cultivadas en medio MS3:1N, las cuales adquirieron características similares a los obtenidos en el presente trabajo al mismo tiempo de cultivo (tres semanas). Lo anteriormente expuesto pone de manifiesto la influencia de la concentración de sales en el medio de cultivo sobre la multiplicación del tejido embriogénico. Sobre este hecho, Leitzke et al. (2009) reporta que variaciones en la concentración de sales en el medio de cultivo pueden afectar la respuesta *in*

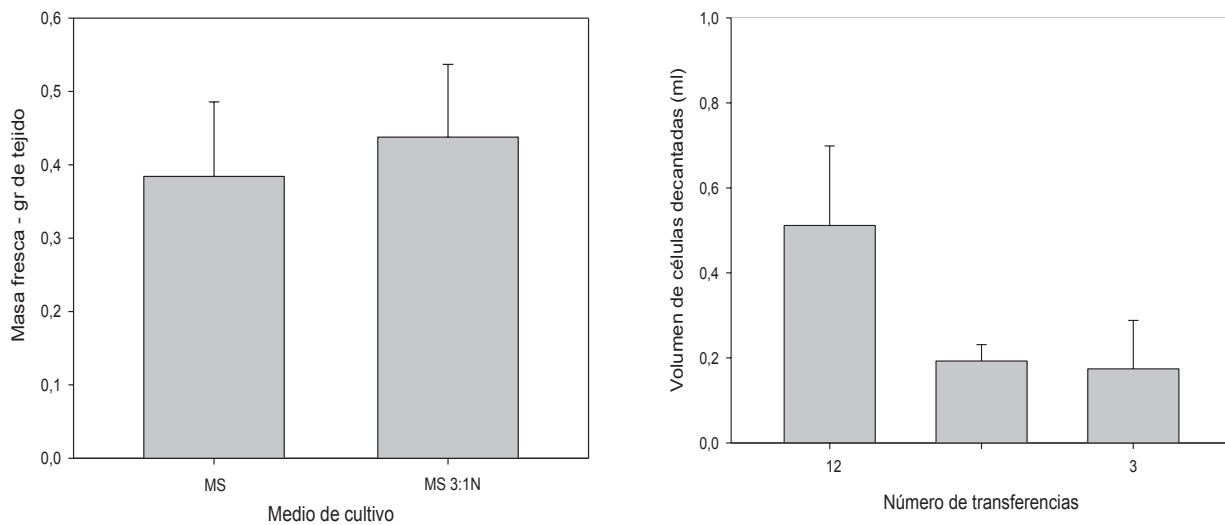


Figura 2. Izquierda: Incremento de masa fresca de tejidos embriogénicos de ñame en dos formulaciones de medio de cultivo MS (Morashige y Skoog) y MS3:1N (Morashige y Skoog modificado por Witjaksono y Litz 1999), después de cuatro semanas de cultivo. Derecha: incremento de volumen de tejidos embriogénicos de ñame durante tres transferencias consecutivas (cada 5 semanas) a medio líquido.

in vitro de los tejidos cultivados evidenciando los requerimientos minerales específicos para cada especie (o cultivar), lo que a su vez haría más eficiente los protocolos de micropropagación. Cunha y Fernandes (1999) encontraron que una relación 2:1 de $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ promovió eficientemente la multiplicación (expresada como el incremento de peso fresco) de cultivos embriogénicos de *Linum usitatissimum* a concentraciones de nitrógeno total de 30 mM, mientras que una relación desbalanceada a favor del amonio (1:2 $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$) y el incremento del nitrógeno total disponible para los tejidos (60 mM) limitaban la proliferación de tejido embriogénico. En el trabajo antes mencionado, el crecimiento de los tejidos embriogénicos fue relacionado linealmente con el incremento de las concentraciones de nitrato, indicando que este ión es un factor limitante en la producción de tejido nuevo y revelando que las altas concentraciones de nitrógeno en el medio de cultivo pueden tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los tejidos vegetales cultivados *in vitro*. Simões et al. (2010) hacen anotaciones similares con base en los resultados obtenidos mientras buscaban establecer el efecto de las sales minerales presentes en diferentes formulaciones de medio de cultivo sobre la formación y desarrollo de embriones somáticos en *Coffea arabica* var. "Catuai".

Selección *in vitro*

Los tejidos mantenidos en medio de selección cambiaron de una coloración blanco opaco a una coloración parda durante los primeros 15 días de cultivo. Esto indica una respuesta de los tejidos ante la eventual presencia de sustancias relativamente tóxicas en el filtrado utilizado, al contrastar con la ausencia de esta respuesta

en los tejidos cultivados en presencia del tratamiento control. Este cambio de coloración de los tejidos se asoció con un deterioro paulatino del tejido, y mostró una relación directa con la concentración del filtrado en el medio de cultivo, haciéndose más acentuada en la medida que aumentaba la concentración de filtrado del hongo. Los cultivos sometidos a selección con filtrado del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* mostraron una pérdida de volumen de los tejidos (Figura 3); no obstante, el análisis estadístico mostró que no existieron diferencias significativas entre los valores de variación de volumen como resultado de los tratamientos evaluados ($P = 0,172$).

Chand et al. (2008) reportaron que la susceptibilidad de varias líneas de cebada a las toxinas de *Bipolaris sorokiniana* incrementaba a medida que la concentración de las toxinas era mayor, proponiendo una relación directa entre el grado de deterioro y la dosis de sustancias tóxicas debido al incremento de la intensidad de la actividad metabólica producto de la necesidad de neutralizar los metabolitos del hongo. Girish et al. (2009) encontraron que tejido calloso inducido a partir de explantes

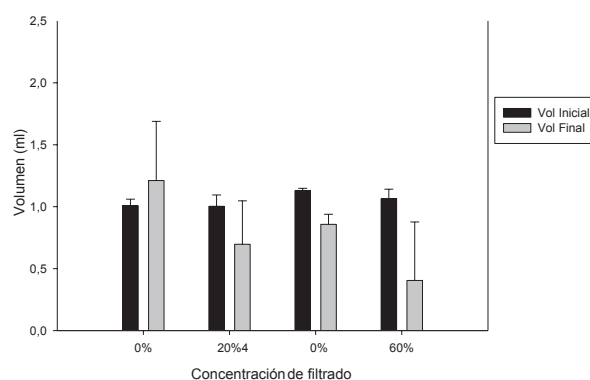


Figura 3. Variaciones del volumen (ml) de los tejidos embriogénicos de ñame sometidos a diferentes concentraciones de filtrado de *Colletotrichum gloeosporioides*.

cotiledonares de neem (*Azadirachta indica*) sometidos a filtrado de *Phomopsis azadirachta* E decrecían a medida que se incrementaban las concentraciones del filtrado, revelando la presencia de metabolitos tóxicos en el mismo; adicionalmente, estos mismos autores afirmaron que los tejidos inducidos *in vitro* son más sensibles a las toxinas que la planta entera, evidenciándose en el cambio de coloración de los tejidos, los cuales se tornan de color café como mecanismo de defensa contra las toxinas, la cual obedece a la muerte de células sometidas a estrés como consecuencia de la producción y acumulación de fenoles (Girish et al. 2009). Patiño et al. (2007) relacionan el pardeamiento y necrosamiento de los tejidos sometidos a selección con la acción fitotóxica de los filtrados de *Colletotrichum acutatum* y la posterior muerte de los mismos. Igualmente, Švábová y Lebeda (2005) sostienen que las toxinas pueden inducir una reacción de defensa en la planta (que puede ser extrapolado a tejidos vegetales aislados o inducidos *in vitro*) dirigida a la síntesis de fitoalexinas o a la muerte de células localizada, en cuyo caso se trataría de una reacción de hipersensibilidad.

Cultivo dual

En el desarrollo de la prueba de crecimiento simultáneo de los tejidos embriogénicos cultivados en presencia del filtrado y una muestra del micelio del hongo, se pudo observar que el micelio creció radialmente durante el tiempo de evaluación haciendo contacto con las MPEs a los 12 días posterior a su inoculación, con una tasa de crecimiento de 3,54 mm día⁻¹. Todos los tejidos evaluados mostraron susceptibilidad al ataque del hongo, evidenciándose un total recubrimiento de las MPEs por parte del micelio a los 20 días de cultivo.

Algunos estudios han mostrado que la selección *in vitro* por si misma no es un mecanismo suficiente para obtener tejidos resistentes a enfermedades, debido a que algunas veces los metabolitos presentes en el filtrado, pese a su fitotoxicidad, no son capaces de inducir el desarrollo de la enfermedad (Slavov 2005). Las conclusiones de coinciden con los resultados obtenidos por Koike et al. (1991), quienes tratando de seleccionar plantas de alfalfa utilizando 10% de cultivo filtrado de *Verticillium albo-atrum*, no encontrando diferencias estadísticamente significativas en el grado de marchitez de plantas del cultivar original y plantas regeneradas seleccionadas y no seleccionadas con el filtrado, por lo que se concluyó que las plantas sometidas a selección no fueron más resistentes al filtrado que las plantas donadoras de explantes y aquellas no seleccionadas. Adicionalmente, los mismos autores obtuvieron cuatro líneas resistentes al filtrado pero no a las conidias del hongo, lo cual muestra las variaciones de la selección de tejidos utilizando filtrados del cultivo. Jayasankar et al. (2000), al respecto, no descartan la posibilidad de que células con resistencia natural se encuentren presentes en las masas proembriogénicas, las cuales serían estimuladas a predominar en el ambiente selectivo.

Desarrollo de embriones somáticos

Las porciones de tejido no seleccionadas exhibieron abundante incremento en volumen cuando fueron cultivadas por cuatro semanas en medio de cultivo sin RCVs, tornándose de color amarillo opaco a blanco, de apariencia embriogénica, independientemente de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. No obstante, la formación de embriones somáticos fue nula y el tejido

mostró una clara tendencia hacia la formación de raíces; las cuales sufrieron deterioro cuando alcanzaban uno o dos milímetros de longitud, provocando la oxidación del tejido que no logra recuperarse completamente incluso luego de varios subcultivos.

Los cultivos embriogénicos seleccionados con filtrado y transferidos a medio MS sin RCVs (30 o 45 g L⁻¹ de sacarosa) no mostraron cambios de algún tipo, como tampoco la formación de tejido nuevo ni necrosis del tejido. Torres (2007) concluyó que MPEs de *D. rotundata* cultivados en medio MS con una concentración de 30 g L⁻¹ de sacarosa desarrollaron menor número de embriones en comparación con aquellos desarrollados en presencia de 45 g L⁻¹. Espitia y Quintero (1999) lograron la regeneración de plantas a partir de embriones somáticos inducidos indirectamente de explantes foliares de *D. alata* (var. Diamante 22). Por otra parte, Torres (2007) logró la regeneración de plantas de *D. rotundata* cv 9811-090, mas no pudo inducir la formación de embriones en explantes provenientes de plantas de ñame de los cultivares 9811-086 (*D. rotundata*) y CB-1172 (*D. alata*), indicando un muy probable efecto genotípico. Kryvenki et al. (2008) afirman que no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo cuando se trabaja con plantas a nivel *in vitro* debido a la alta influencia que tiene el genotipo sobre la respuesta morfogénica, por lo que recomiendan trabajar con varios genotipos de una misma especie para aumentar la probabilidad de extrapolar resultados a varios cultivares dentro de la especie. Recientemente, Deng et al. (2009) reportaron el incremento en la frecuencia de formación de embriones somáticos de *Populus tomentosa* como resultado de la expresión incrementada del gen

BBM (Baby Boom) en células transformadas; esta estrategia puede modificar sustancialmente la metodología para inducción de embriogénesis somática en plantas.

CONCLUSIONES

El medio de cultivo modificado MS3:1N indistintamente del estado en que se encuentre (semisólido o líquido), permite una óptima proliferación de MPEs de ñame, no obstante, la proliferación en medio de cultivo MS semisólido suplementado con 1.5 o 2.0 mgL⁻¹ de 2,4-D es nula. Por otra parte, la utilización de medio de cultivo MS sin suplemento de reguladores de crecimiento induce la formación de raíces y posterior deterioro del tejido en lugar de la formación de embriones somáticos en ñame var. Pico botella.

Bajo las condiciones de cultivo evaluadas en el presente trabajo de investigación, el filtrado de *Colletotrichum gloeosporioides* induce el necrosamiento de los tejidos embriogénicos de ñame, sin evidenciarse la selección de líneas embriogénicas resistentes al filtrado del hongo.

REFERENCIAS

- Amusa, N. 2006.** Microbially produced phytotoxins and plant disease management. African Journal of Biotechnology 5(5):405-414
- Bustamante, S. y Buitrago, G. 2006.** Molecular Characterization of Colombian Yam Germoplasm by Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci. (SAMPL). Revista Colombiana de Biotecnología 8(2):60-66.

- Chamandoosti, F. 2009.** In vitro selection: a novel source of resistance to *Sclerotiniastem* rot in canola (*Brassica napus* L.). Asian Journal of Plant Pathology 3(1):8-13.
- Chand, R.; Devyani, S.; Prasad, K.; Singh, A.; Bashyal, B.; Prasad, L. y Joshi, A. 2008.** Screening for disease resistance in barley cultivars against *Bipolarissorokiniana* using callus culture method. Indian Journal of Experimental Biology 46:249-253.
- Cunha, A. y Fernandez, M. 1999.** Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.) Effect of carbon source, total inorganic nitrogen and balance between ionic forms and interaction between calcium and zeatin. Journal of Plant Physiology 155(4-5):591-597.
- DANE (Departamento Administrativo Nacional de Estadística). 2011.** Matriz de empleo en la base 2005 de las cuentas nacionales. Dirección de Síntesis y Cuentas Nacionales, Departamento Administrativo Nacional de Estadística. p34.
- Deng, W.; Luo, K.; Li, Z. y Yang, Y. 2009.** A novel method for induction of plant regeneration via somatic embryogenesis. Plant Science 177(1):43-48.
- Deo, P.; Tyagi, A.; Taylor, M.; Harding, R. y Becker, D. 2010.** Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences 28:27-40.
- Espitia, A. y Quintero, I. 1999.** Estandarización de la técnica de micropropagación por embriogénesis somática en ñame (*D. alata* var. Diamante 22). Tesis Ingeniero Agrónomo, Universidad de Córdoba, Montería.
- Fehér, A.; Pasternak, T. y Dudits, D. 2003.** Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 74:201–228.
- Girish, K.; Shankara, S. y Raveesha, K. 2009.** Crude toxin extract from culture filtrate of *Phomopsis azadirachtae* infecting neem and its phytotoxicity. Internacional Journal of Integrative Biology 6(2):79-84.
- Green, K. 1994.** Studies on the Epidemiology and Control of Yam Anthracnose. Tesis Ph.D. University of Reading, Reading, UK.
- Gray, D. 1996.** Nonzygotice embryogenesis. En: Trigiano, R. y D. Gray (ed). Plant tissue concepts and laboratory exercises. CRC Press, Boca Ratón – New York, p133-147.
- Jayasankar, S.; Zhijian, L. y Gray, D. 2000.** In vitro selection of *Vitis vinifera* “Chardonnay” with *Elsinoe ampelina* culture filtrate is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. Planta 211:200-208.
- Jayasankar, S. y Litz, R. 1998.** Characterization of resistance in mango embryogenic cultures selected for resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* culture filtrate and phytotoxin. Theoretical and Applied Genetics 96:823-831.

- Kao, K. y Michayluk, M. 1980.** Plant regeneration from mesophyll protoplast of alfalfa. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 96:135-141.
- Koike, M.; Yoshida, Y.; Kagaya, Y. y Shimada, T. 1991.** In vitro selection and somaclonal variation in alfalfa Verticillium Wilt. *Plant Tissue Culture Letters* 8(3):152-157.
- Kryvenki, M.; Kosky, R.; Guerrero, D.; Domínguez, M. y Reyes, M. 2008.** Obtención de callos con estructuras embriogénicas de *Stevia rebaudiana* Bert. en medios de cultivo semisólidos. *Biotecnología Vegetal* 8(2):91-98.
- Leitzke, L.; Damiani, C. Y Schuch, M. 2009.** Multiplicação e enraizamento *in vitro* de amoreira-preta 'xavante': Efeito da concentração de sais, do tipo de explante e de carvão ativado no meio de cultura. *Ciência e Agrotecnologia* 33:1959-1966.
- Mozsár, J. y Viczián, O. 1996.** Genotype effect on somatic embryogenesis and plant regeneration of *Vitis* spp. *Vitis* 35(4):155-157.
- Oláh, R.; Zok, A.; Pedryc, A.; Howard, S. y Kovács, L. 2009.** Somatic embryogenesis in a broad spectrum of grape genotypes. *Scientia Horticulturae* 120:134-137.
- Patiño, C.; Hoyos, R. y Afanador, L. 2007.** Selección y regeneración *in vitro* de somaclones de tomate de árbol (*Solanum betaceae* Cav. Sendt) utilizando filtrados de cultivo de *Colletotrichum acutatum* con actividad pectinasa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía* 60(2):3923-3937.
- Pérez, A.; Rojas, J.; Chamorro, L. y Pérez, K. 2011.** Evaluación *in vitro* de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum* spp. *Acta Agronómica* 60(2):158-164.
- Simões, M.; Moura, I.; Barros, M. y Rodrigues, C. 2010.** Effect of mineral salts, vitamins and gelling agents on somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. 'catuai'. *Revista de Ciências Agrárias* 33(2):192-200.
- Slavov, S. 2005.** Phytotoxins and *in vitro* screening for improved disease resistant plants. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 19(3):48-54.
- Švábová, L. y Lebeda, A. 2005.** *In vitro* selection for improved plant resistance to toxin-producing pathogens. *Journal of Phytopathology* 153:52-64.
- Torres, L. 2007.** Desarrollo de un protocolo de micropropagación en ñame (*Dioscorea* spp) a través de embriogénesis somática. Tesis Biólogo, Universidad de Córdoba, Montería.
- Witjaksono y Litz R. 1999.** Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 59:19-29.