

**USO DE MARCADORES MOLECULARES EN LA CARACTERIZACIÓN
GENÉTICA DEL ÑAME (*Dioscorea* SPP) EN COLOMBIA**

CHRISTIAN CAMILO CASTAÑEDA CARDONA

CÓDIGO: 1121845101

SANDRA PATRICIA MONTENEGRO GOMEZ. PhD.

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS, PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA
VILLAVICENCIO, 2018**

RESUMEN

El ñame (*Dioscorea* spp.) es una especie de importancia económica a nivel mundial, es el cuarto tubérculo más consumido en el mundo. Es cultivado principalmente en Gambia y Nigeria, y en países de Latinoamérica como lo son Brasil, Costa Rica, Venezuela y Colombia. El ñame hace parte de la alimentación de poblaciones principalmente de la región Caribe colombiana, y en menor medida en la región de los Llanos Orientales y la Amazonía, sin embargo, a pesar de su poco consumo en esta región, es el principal tubérculo como sustituto de la papa (*Solanum tuberosum* L.) en comunidades indígenas y sectores rurales. A finales de la década del ochenta, el cultivo se vio afectado fuertemente por la antracnosis, acabó con la mayoría de los cultivos de la región caribe, esto como consecuencia a la propagación vegetativa o el uso de semilla asexual, por esta razón en países productores de ñame incluyendo a Colombia, han realizado estudios biotecnológicos para conocer la diversidad de cultivares, conseguir semillas libres de patógenos con resistencia a la antracnosis principalmente. El mejoramiento del ñame es difícil y presupone un conocimiento de la diversidad genética del germoplasma de *Dioscorea* en Colombia, la cual no se conoce todavía. Por lo tanto, el presente trabajo busca conocer las principales técnicas moleculares empleadas para la caracterización genética de especies del género *Dioscorea*, así como el uso y empleo del ñame en la alimentación e industria. Se realizó una búsqueda en fuentes bibliográficas sobre el uso del ñame, caracterización molecular, diversidad genética y uso de la biotecnología en el cultivo del ñame. En los países productores se han hecho múltiples investigaciones en busca del mejoramiento genético de la especie, así como la obtención de semillas a partir de cultivo de tejidos in vitro, sin embargo, en Colombia los estudios no han sido suficientes para caracterizar los cultivares de *Dioscórrea*, pues en la región de la Orinoquia aún no hay estudios sobre caracterización de especies silvestres y cultivadas.

ABSTRACT

The yam (*Dioscorea* spp.) Is a species of economic importance worldwide, it is the fourth most consumed tuber in the world. It is cultivated mainly in Ganha and Nigeria and in Latin American countries such as Brazil, Costa Rica, Venezuela and Colombia. The yam is part of the feeding of populations mainly from the Colombian Caribbean region, and to a lesser extent in the region of the Eastern Plains and the Amazon, however, despite its low consumption in this region, it is the main tuber as a substitute of potato (*Solanum tuberosum* L.) in indigenous communities and rural sectors. At the end of the eighties, the crop was strongly affected by anthracnose, ending most of the crops in the Caribbean region, this as a result of vegetative propagation or the use of asexual seed, for this reason in producing countries of yam including Colombia, biotechnological studies have been conducted to know the diversity of cultivars, get seed free of pathogens with resistance to anthracnose mainly. The improvement of the yam is difficult and presupposes a knowledge of the genetic diversity of *Dioscorea* germplasm in Colombia, which is not yet known. Therefore, the present work seeks to know the main molecular techniques used for the genetic characterization of *Dioscorea* species, as well as the use and use of yam in food and industry. A search was made in bibliographic sources about the use of yam, molecular characterization, genetic diversity and the use of biotechnology in yam cultivation. In the producing countries there have been multiple investigations in search of the genetic improvement of the species, as well as the obtaining of seeds from tissue culture in vitro, however, in Colombia the studies have not been enough to characterize the cultivars of *Dioscorea*, because in the Orinoquia region there are still no studies on the characterization of wild and cultivated species.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. GENERALIDADES DEL GÉNERO <i>Dioscorea</i> spp.....	3
1.1.1. Cultivo del ñame	5
1.1.1.2. Principales usos del ñame	7
1.2. USO DE MARCADORES MOLECULARES.....	10
1.2.1. Marcadores moleculares para la caracterización del ñame (<i>Dioscorea</i> spp)	16
1.3. PERSPECTIVAS DEL ÑAME EN COLOMBIA	19
2. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	20
REFERENCIAS	21

LISTA DE TABLAS

Tabla N° 1. Clasificación taxonómica de género Dioscorea spp.	4
Tabla N° 2. Composición nutricional del ñame por cada 100g.	8

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1. Bulbillos aéreos de <i>Dioscorea alata</i> . Foto tomada por el autor diciembre de 2016.	6
Figura N° 2. Marcadores moleculares que utilizan o no la técnica de PCR.	12
Figura N° 3. Patrones de bandas generadas por el cebador TG en genotipos de palma de aceite (<i>Elaeis guineensis</i> Jaq). Fuente: (Castañeda C, 2015).....	14
Figura N° 4. Descripción grafica de la aplicación de RFLPs. Tomado de: http://www.slideshare.net/atikaagarwal/rflp-2513	16

1. INTRODUCCIÓN

El ñame (*Dioscorea* spp.) es el cuarto tubérculo más importante en el mundo en términos económicos, después de la papa (*Solanum tuberosum* L.), la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y la batata (*Ipomoea batata* L.) (Dansi *et al.*, 2013). A nivel mundial, especies comestibles del género *Dioscorea* son la principal fuente de calorías y, por lo tanto; son también alimentos de alto valor cultural que están implicados en la seguridad alimentaria a nivel local (Adejumo *et al.*, 2013). Por ejemplo, en Venezuela el Ministerio de Agricultura y Tierras (2008) reporta al ñame como parte de los recursos fitogenéticos que se cultivan en el territorio a pequeña escala y es consumido a lo largo del Estado venezolano.

La familia *Dioscoreae* cuenta con seis géneros el cual se destaca el *Dioscórrea* spp por tener el mayor número de especies reportadas que oscilan en 600. Dentro de las 600 especies que se agrupan bajo este género, sólo 10 son cultivadas y la mayoría son utilizadas en la alimentación humana. La *Dioscorea alata* L. y *Dioscorea rotundata* Poir se cultivan obteniendo de ellas los tubérculos, estos hacen parte de la alimentación de millones de personas alrededor del mundo (Perea, 2000), por lo que proporcionan carbohidratos y algunas reducidas cantidades de fibra y proteína (Alvis *et al.*, 2008; Blanco *et al.*, 2004).

El género *Dioscorea* posee una amplia variedad de especies de importancia económica por su valor alimenticio y metabolitos secundarios usados en la industria farmacológica, los metabolitos secundarios más comunes son las saponinas esteroidales. Las zonas tropicales y subtropicales son la región donde se distribuye este género (Montaldo, 1991). El ñame tiene una diversidad genética amplia, tanto a nivel inter-específico como intra-específico (Martin y Rhodes, 1977). La diversidad del ñame en estado silvestre es reducida por la domesticación del cultivo (Mignouna y Dansi, 2003).

El uso de marcadores genéticos permitió la caracterización de especies de este género, sin embargo, los marcadores morfológicos son reducidos y limitados por lo que es importante implementar los marcadores moleculares ya que son una herramienta de exploración de la diversidad genética, no están sujetos a factores ambientales por lo que no dependen de una época del año para ser evaluados, son fenotípicamente neutros, pueden ser usados a edades tempranas, son funcionales en todo tipo de material vegetal, presentan mayor segregación siendo altamente polimórficos (Azofeifa, 2006).

Por las anteriores razones en el mundo se ha hecho estudios morfológicos y moleculares. En Colombia se han realizado estudios en caracterización molecular de diversas especies de *Dioscorea* y sus relaciones de herencia. Sin embargo, no han sido suficiente las investigaciones para describir el ñame utilizando caracteres morfológicos; isoenzimas (Hamon y Toure, 1990) y moleculares pues los resultados no concluyen por la variabilidad del género (Tamiru *et al.*, 2007). En regiones como la Orinoquia existen pocos estudios sobre este tema por lo que es importante conocer la diversidad de este cultivo y de especies silvestres, lo cual el indagar sobre los estudios realizados a nivel nacional permitirá saber el estado del arte de las investigaciones realizadas con marcadores moleculares en *Dioscorea* e identificar los estudios requeridos para el conocimiento de la distribución y diversidad de este género.

1.1. GENERALIDADES DEL GÉNERO *Dioscorea* spp

La familia *Dioscoreaceae* está compuesta por nueve géneros y aproximadamente 600 especies. De las cuales 25 han sido reportadas como comestibles. El género *Dioscorea* spp., posee, en gran medida, las especies cultivadas y silvestres de esta familia. Están distribuidas en la zona tropical y sub tropical de los continentes de Asia, África y América.

son plantas perennes con raíces tuberosas o cáudices, tallos trepadores y pequeñas flores de color amarillo-verde. La mayoría de las especies son dioicas, con plantas masculinas y femeninas separadas, aunque algunas son monoicas, con flores masculinas y femeninas en la misma planta (Universidad de Oxford, s.f). Los tubérculos de algunas especies pueden tener hasta 1,5 metros de longitud.

A diferencia de otras raíces y tubérculos, el ñame cuenta con una vasta diversidad genética y diferentes centros de origen como los son en el sudeste asiático, África occidental y América tropical (González, 2012). El ñame es una planta monocotiledónea, presenta un tallo modificado de almacenamiento que lo hace atractivo para la industria alimentaria principalmente, de allí la importancia como especie cultivable en muchas regiones tropicales del mundo, por pequeños y medianos cultivadores usada como fuente de ingresos y comercialización.

La clasificación taxonómica es la siguiente, según Janssens, (2011) citado por González, (2012).

Tabla N° 1. Clasificación taxonómica de género *Dioscorea* spp.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Dioscoreales
Familia	Dioscoreaceae
Género	<i>Dioscorea</i>

Fuente: González, 2012.

Bressan subdivide el género *Dioscorea* debido a que es muy amplio, por lo que agrupa a las especies *Dioscorea rotundata* Poir., *Dioscorea alata* L., *Dioscorea cayenensis* Lam., *Dioscorea opposita* Thunb. Y *Dioscorea japonica* Thunb en la sección *Enantrophyllum*; *Combilium* está la *D. esculenta*; *Osophyton* está *Dioscorea bulbifera* L. y en la sección *Macrogynodium* se encuentra la *Dioscorea trifida* L. Entre estas secciones se encuentran diferencias morfológicas que permiten la identificación de cada especie, por ejemplo, las que pertenecen a *Enantrophyllum*, se caracterizan por tener el tallo torcido en el sentido de las manecillas del reloj. El resto de las secciones no ocurre de esta forma.

En general las plantas cultivadas de este género se caracterizan por tener hojas acorazonadas, alternas u opuestas, con peciolo alado, flores en panícula o en racimo. El tallo crece en forma de espiral, de forma cuadrangular y dependiendo de la dirección que tome se puede identificar si es un tipo de ñame diferente. El tubérculo varía según la especie.

Los principales ñames usados para la agricultura, han sido descritos por Montaldo en 1991, entre los principales se describe los siguientes:

D. alata: presenta un solo tubérculo o varios, entre 2 y 4 en forma agrupada. Pueden presentar diferentes formas como ovalada, redonda o irregular. Pueden alcanzar un peso entre 2 y 3 kg. En la parte axilar de las hojas se forman tubérculos aéreos. Los tallos son de color verde o morado, alado y sin espinas.

D. cayenensis: produce un solo tubérculo que puede pesar entre 1 a 10 kg. Tallo cilíndrico, espinoso. Hojas simples, erectas y opuestas. Después de la *D. alata*, sigue en importancia cultivada África Occidental y en América tropical.

D. bulbifera: presenta un tubérculo subterráneo por planta, produce tubérculos aéreos que alcanzan los 200 g. sus tallos son cilíndricos, sin espinas y tuercen a la izquierda. Son cultivados principalmente en sudeste asiático. Este tubérculo conocido como ñame Congo es una planta de origen asiático en las regiones comprendidas entre Indonesia y Malasia, que desarrolla en las axilas de las hojas unos bulbos comestibles. Se caracterizan por tener una coloración café claro en la parte externa y un color amarillo en su parte interna. El tamaño del tubérculo puede ser de largo entre 26-93,5 mm y el ancho de 26,5-77,5 mm (Rincón *et al.*, 2000). se seleccionan según el peso, los mayores a 80 g se consideran de primera, lo que se encuentran entre 40-80 g se consideran de segunda y los bulbillos menores a 40 g se consideran de tercera.

D. trifida: los tubérculos tienen una longitud aproximada de 15 cm, son redondos o cilíndricos, la coloración de la pulpa puede ser blanca, amarilla o morada. Presenta tallo cuadrangular, alado y sin espinas, y tuerce a la izquierda. Las hojas son palmadas y alternas. Es originaria de América.

1.1.1. Cultivo del ñame

El cultivo de ñame usa semilla asexual para propagarlo, es decir, usan tubérculos para la siembra, puesto que la especie presenta alta heterocigosidad, además es

dioica y la madurez de las flores masculinas ocurren 25 días después que las flores femeninas (Bressan, 2005). En general el ñame es una planta enredadera que puede tener tubérculos aéreos y subterráneos, estos últimos son los más utilizados para su consumo alimenticio y como semilla para nuevos cultivos.



Figura N° 1. Bulbillos aéreos de *Dioscorea alata*. Foto tomada por el autor diciembre de 2016.

Para implementar el cultivo del ñame se debe realizar en zonas tropicales con climas cálidos y húmedos con temperaturas entre 25 a 30 °C, con un promedio de precipitación de 1500 mm distribuidos en el año, con suelos bien drenados. Para la preparación del suelo se requiere que sea plano, sin presencia de árboles, o rocas que impidan el uso de maquinaria. Se hace un arado profundo, un pulidor y uso de la hoyadora donde irán las semillas de ñame, luego de seleccionado los tubérculos con un peso entre 100 y 150 g, se hace la siembra antes del inicio del periodo de lluvias en los meses de febrero y marzo. La semilla debe cumplir el tiempo de dormancia, estas semillas son tratadas con fungicidas e insecticidas por un tiempo de 5 minutos, se deja secar en sombra, este procedimiento se realiza para evitar el

ataque de plagas y enfermedades, la germinación se hace a los 30 días después de la siembra (Álvarez, 2000).

Este cultivo es de pequeños y medianos agricultores por lo que necesita de mayor mano de obra que los cultivos tecnificados de grandes extensiones. Aproximadamente para la realización de 6000 hoyos para la siembra del ñame, se necesitan en promedio 30 jornales (Reina, 2012). El cultivo puede ser alternado con otros cultivos que le sirven de cobertura destacándose la patilla, el maíz y la yuca. Debido a su hábito trepador, el ñame necesita de tutorado para mayor aprovechamiento de la luz, el maíz se puede usar con fines de tutorado, para esto se recomienda una variedad de porte bajo y de caña gruesa que se mantenga en pie por varios meses. La cosecha se realiza en los meses de noviembre a enero, siendo los meses de julio y agosto donde hay menos oferta de este producto alimenticio. Posterior a la cosecha es transportado a los acopiadores que distribuyen la producción entre la demanda local y los puertos para exportación.

1.1.1.2. Principales usos del ñame

En las regiones del mundo donde se cultiva el ñame, hace parte fundamental de la dieta, por lo cual es usado con la elaboración de alimentos. A continuación, se observa la tabla nutricional.

Tabla N° 2. Composición nutricional del ñame por cada 100g.

Compuesto	Cantidad	Medida
Agua	69,60	Gramos
Calorías	118	kilocalorías
Proteínas	1,53	gramos
Grasa	0,17	gramos
Carbohidratos	27,88	gramos
Fibra	4,1	gramos
Azúcar	0,50	gramos
Calcio	17	miligramos
Hierro	0,54	miligramos
Magnesio	21	miligramos
Fosforo	55	miligramos
Potasio	816	miligramos
Sodio	9	miligramos
Zinc	0,24	miligramos
Vitamina	17,1	miligramos
Tiamina	0,112	miligramos
Riboflavina	0,032	miligramos
Niacina	0,552	miligramos
Vitamina B-6	0,293	miligramos
Vitamina A, RAE	7	microgramos_RAE
Vitamina A, IU	138	IU
Vitamina E	0,35	miligramos
Colesterol	0	miligramos

Fuente: USDA -United State Department of Agriculture. National Agricultural library.
<http://www.nal.usda.gov>

En la costa caribe de Colombia el ñame se prepara en salado como en dulce, es usado para espesar sopas y cremas, o para la preparación del dulce de ñame. Este tubérculo es culturalmente conocido entre los habitantes de esta región por ser considerado un alimento afrodisiaco y con propiedades medicinales.

En Cartagena en el año 2016, se realizó el ñameton. Un evento realizado por la gobernación de Bolívar para vender ñame al detal y sus derivados como el mote y cuajadera de ñame. Este evento fue un éxito total, donde se vendieron más de 20 toneladas y se cerraron negocios con almacenes de grandes superficies por más de 150 toneladas.

En el corregimiento de San Cayetano del municipio de San Juan de Napomuceno, se celebra el festival del ñame, el cual va en su XXIX versión, en donde se disfruta de diversas muestras culturales y gastronómicas a base de este tubérculo. Entre los platos más representativos están el brownie, el flan, la cocada, la chicha, entre una gran variedad de dulces (Gobernación de Bolívar, 2017). En este festival se realiza el concurso al ñame más grande donde participan diferentes agricultores, que en versiones anteriores han cosechado ñames de 80 kg.

En Bogotá, la ciudad con mayor población en Colombia, también hace parte de los de mayor demanda de ñame en el país, en muchos lugares se comercializa ñame silvestre por sus propiedades medicinales.

La industria también hace uso del tubérculo para la producción de medicamentos, puesto que posee metabolitos secundarios como los sapogeninas y las diosgeninas usadas para la elaboración de esteroides. Adicional al uso comestible y farmacéutico, también son usadas para la obtener bioplásticos (Rivera *et al.*, 2012). Por estas razones, se han hecho estudios aplicando la biotecnología en el mejoramiento genético del ñame y obtención de semilla de calidad para el desarrollo de cultivos.

En Cuba se realizó el estudio de producción de microtubérculos de ñame por medio del Sistema de Inmersión Temporal (SIT), evaluándolos en campo para observar la respuesta morfoagronómica de las plantas teniendo como variables la brotación, la

supervivencia y el posterior desarrollo de las plantas derivadas de ellos en campo (Cabrera *et al.*, 2010).

En Colombia en 1997 se crea el Programa Colombiano de Biotecnología Agrícola apoyado por el gobierno de Holanda, se realiza el proyecto “Programa Regional de producción de semillas de ñame empleando algunas variedades de la Costa Atlántica colombiana”. Debido a la no disponibilidad de semillas de calidad, lo que hace del ñame un cultivo susceptible a la antracnosis. Perea expresó sobre el uso de la biotecnología aplicada a los sistemas *in vitro* para contribuir de manera eficaz a la solución de problemas en cultivos de interés agrícola. En el programa realizado con Holanda, Perea desarrolló cultivos *in vitro* a través de uso de segmentos nodales, meristemos y microtuberización (Perea, 2000).

Según Ovono *et al.* (2007) y Balogun (2009), los microtubérculos son una alternativa en los programas de producción de semillas, mejoramiento genético y conservación de germoplasma, esto se debe a que la producción de estos no se rige a una época del año, sino que se pueden producir en cualquier momento en condiciones controladas, además mantienen por mayor tiempo el vigor vegetativo sin perder el potencial de brotación.

1.2. USO DE MARCADORES MOLECULARES

Estos son descritos como una herramienta importante para diferentes campos de las ciencias como son la agronomía, el fitomejoramiento, ecología, botánica, fitopatología, medicina, entre muchas otras que ven en el empleo de esta técnica un instrumento útil para llevar a cabo investigaciones.

Para tener claridad en qué son los marcadores moleculares primero se define que es un marcador. Un marcador es considerado como un carácter que se manifiesta

a nivel morfológico que es lo referente al fenotipo, bioquímico (resultado del proceso de traducción del ADN) y molecular (ácidos nucleicos principalmente). Para establecer la relación entre un locus y un carácter determinado, se emplea los marcadores moleculares.

Algunas biomoléculas como los marcadores moleculares se pueden relacionar con un carácter. Esta relación con una característica específica, son interés porque permiten diferencias genotipos que la contengan con los que no la posean, proporcionando información de interés sobre la diversidad genética (Camargo, 2014). Otra definición dada por Rieger et al. (1982) los define como cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente utilizada en el análisis genético y Gale (1994) los define como cualquier medio para identificar cualquier locus específico en un cromosoma.

Estos marcadores presentan unas ventajas con respecto a otro tipo de marcadores como los morfológicos, las principales ventajas se numeran a continuación:

- Sin influencia ambiental y neutros.
- Cantidad ilimitada
- Amplia cobertura del genoma
- Alto nivel de polimorfismo
- Más informativos (en general codominantes)
- Análisis en fases tempranas
- Sencillos, prácticos y objetivos.

Algunos usos de esta herramienta en las ciencias básicas son la utilización como un indicador de diversidad genética usado en programas de manejo y conservación de recursos genéticos. En estudios de sistemática como la filogenia y la taxonomía. Los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción conocidos por sus siglas como AFLPs, son implementados en estudios de genética de poblaciones,

para la caracterización germoplasma, estudios filogenéticos de cualquier ser vivo y para el mapeo del genoma. Es una combinación de técnicas de RFLPs y de PCR. Está basada en la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción (usando enzimas de restricción ER) mediante la PCR.

En las ingenierías agrícolas y forestales son usados para mejoramiento genético (MAS, Selección Asistida de Marcadores o Markers Assisted Selection por sus siglas en inglés). Detección de individuos “exóticos” como fuente de genes de interés biotecnológico.

Los marcadores moleculares se pueden clasificar de dos maneras, los que son basados en la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y los que no lo son. En la figura siguiente se observan dichos marcadores.

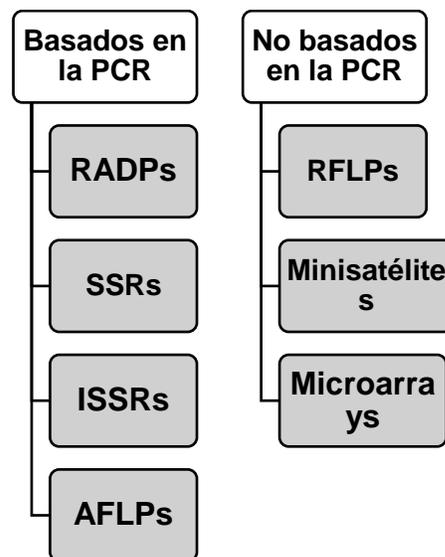


Figura N° 2. Marcadores moleculares que utilizan o no la técnica de PCR.

La técnica PCR se basa en la multiplicación de millones de copias de fragmentos de ADN. Para llevar a cabo esta técnica se necesita de una cadena molde de ADN, un segmento corto de ADN de cadena sencilla complementarios del fragmento a amplificar (cebador), una enzima encargada de la polimerización del ADN (DNA taq

Polimerasa) que va a incorporar los nucleótidos libres (dNTPs) a la cadena complementaria.

La técnica RAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar) implementa la técnica de PCR utilizando un único iniciador arbitrario. Usa un iniciador de poca longitud (10 nucleótidos) y con un alto contenido en guanina-citocina. El polimorfismo detectado se debe a presencia o ausencia del fragmento amplificado. Su utilidad radica en la elaboración de mapas genéticos, en la identificación genética de individuos (Rentería, 2007).

Los ISSRs o secuencias intersimples repetidas, mezclan las propiedades de los RAPDs y los SSRs, es una técnica nueva (Culler & Wolfe, 2001; citado por Rentería M, 2007). Las bandas que se obtienen se encuentran entre los 100 a 2000 pares de bases. La variación que se observa consiste en la presencia o ausencia de las bandas amplificadas.

Las secuencias de los ISSRs son largas si se tienen como referencia al marcador RAPDs, conlleva a una mayor reproducibilidad de las bandas y la obtención de variantes encontrados en el ADN nuclear principalmente (González & Aguirre, 2007). Se pueden usar en plantas, animales y microorganismos. Se usan primers con secuencias cortas, repetidas y secuencias degeneradas (no específicas). Este método es altamente reproducible y permite la detección de polimorfismo en el ADN intra e inter-específicos.

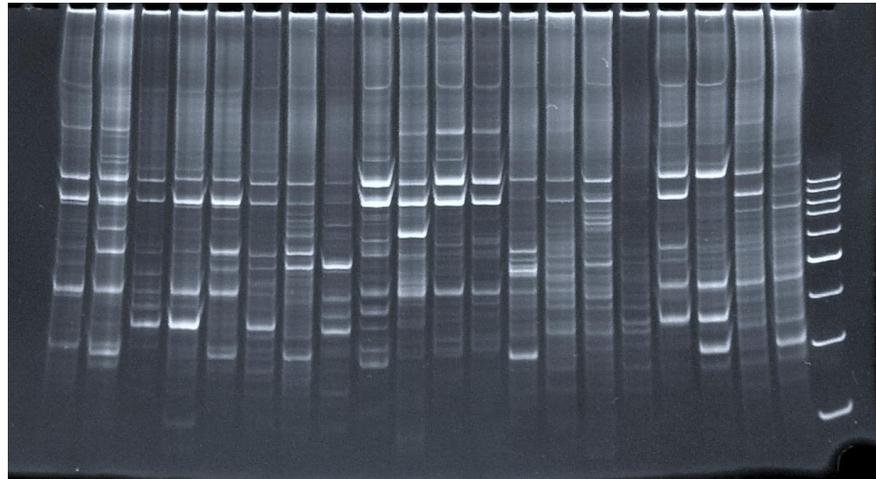


Figura N° 3. Patrones de bandas generadas por el cebador TG en genotipos de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jaq). Fuente: (Castañeda C, 2015).

Los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción conocidos por sus siglas como AFLPs, son implementados en estudios de genética de poblaciones, para la caracterización germoplasma, estudios filogenéticos de cualquier ser vivo y para el mapeo del genoma. Es una combinación de técnicas de RFLPs y de PCR. Está basada en la amplificación selectiva de los fragmentos de restricción (usando enzimas de restricción ER) mediante la PCR.

Este marcador presenta 4 pasos en el laboratorio que consisten en una cadena molde de ADN es digerida por las enzimas de restricción Mse I y Eco RI (Digestión), luego ocurre la unión de los adaptadores a los fragmentos de restricción (ligación), posteriormente se hace la PCR para amplificar los subconjuntos específicos de los productos de digestión del ADN (amplificación) y por último se detecta el polimorfismo haciendo separación de moléculas según el peso por medio de un campo eléctrico siendo observables al entrar en contacto con el bromuro de etidio o nitrato de plata (Electroforesis).

Las secuencias simples repetidas o SSRs por sus siglas en inglés, también conocidos como microsatélites son secuencias repetidas en tándem en la que el motivo repetido está entre 1 a 4 nucleótidos. para la PCR se utilizan cebadores

específicos que son complementarios a las secuencias que flanquean el microsatélite. El polimorfismo detectado se debe a diferencias en el número de repeticiones. Los microsatélites de ADN nuclear han sido utilizados para la caracterización genética de especies animales y vegetales, han sido usados para detectar microsatélites en los organelos transmitidos uniparentalmente como los cloroplastos y las mitocondrias, lo que ha llevado a estudios de evolución y de paternidad (Renteria, 2007) Los SSRs tienen ventaja sobre los anteriores marcadores porque son codominantes, altamente específicos, un solo locus genético por microsatélite por lo que hace más fácil y confiable la lectura.

polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) Se basa en la presencia o ausencia de sitios de reconocimiento para una determinada enzima de restricción. Estas enzimas son endonucleasas bacterianas que identifica la secuencia de ADN y la corta. Los cambios en los sitios de restricción pueden deberse a mutaciones, deleciones, inserciones, o arreglos en el genoma por translocaciones e inversiones que generan la ganancia o pérdida de secuencias de reconocimiento. De estos se obtienen mapas genéticos.

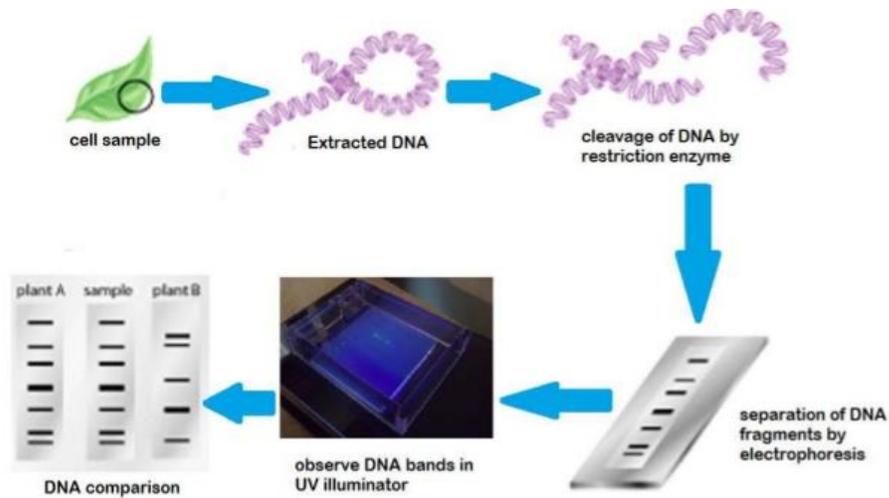


Figura N° 4. Descripción grafica de la aplicación de RFLPs. Tomado de: <http://www.slideshare.net/atikaagarwal/rflp-2513>.

1.2.1. Marcadores moleculares para la caracterización del ñame (*Dioscorea spp*)

En la caracterización molecular existen varias herramientas disponibles para estimar y caracterizar la diversidad genética, entre los cuales están los AFLPs (Amplified Fragments Length Polymorphism DNA) usados en *D. alata* y *D. rotundata* para encontrar QTLs (quantitative trait locus) que confieran resistencia al virus del mosaico en ñame (*D. rotundata*) y antracnosis en *D. alata* (Mignouna *et al*, 2007). También implementados en la caracterización de colecciones de ñame en la región caribe colombiana.

Los ISSRs o marcadores moleculares RAMs, es una técnica reproducible, de fácil implementación, se usan primers con secuencias cortas repetidas y secuencias degeneradas o no específicas. El método permite medir la diversidad genética entre organismos de la misma especie como también entre poblaciones (Muñoz *et al.*, 2008).

El uso de marcadores moleculares para la caracterización de especies del género de *Dioscorea* fueron implementadas en el continente africano por países como Costa de Marfil, Gambia y Nigeria, que en la actualidad son los principales productores y exportadores de ñame en el mundo. Otoo, Anokye y Tetteh. (2015) realizaron investigaciones en *Dioscorea alata* incluyeron un total de 49 accesiones, de las cuales 35 son de Gambia y 14 son del IITA (Instituto Internacional de Agricultura Tropical) en Nigeria, Investigaron la variabilidad genética y las relaciones entre algunas accesiones usando 14 pares de cebadores SSRs disponibles para los ñames.

En Brasil, El productor de ñame más grande de América ha realizado algunos estudios de caracterización molecular, para uno de estos estudios usaron nueve pares de cebadores microsatélites (SSR) con un total de 36 accesiones de *D. alata*, Diez fueron recolectados en mercados locales de varios municipios de Brasil, Ocho fueron obtenidos de la colección de germoplasma del Instituto Agronómico de Campinas, (IAC) y dieciocho se recogieron directamente de los productores del estado de São Paulo (Siqueira *et al.*, 2012). En otro estudio usaron los microsatélites para estimar la diversidad genética en las especies de *D. cayenensis* y *D. rotundata* (Silva *et al.*, 2014). También evaluaron nuevos microsatélites para diversidad genética en *D. alata* y para otras especies de *Dioscorea* donde aislaron 14 marcadores microsatélites polimórficos codominantes, de los cuales seis mostraron transferibilidad para la especie *D. bulbifera*, *D. Cayenensis* *D. rotundata* y *D. trifida*.

En Costa Rica, Aguilar Reyes en el año 2012, realizó su tesis de posgrado usando accesiones de *Dioscórrea spp* del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) caracterizándolas de manera fenotípica y contrastando con la variabilidad encontrada desde el genoma. Este estudio concluyó en la conformación de 6 grupos, destacándose uno conformado por accesiones de *D. alata* procedentes de la isla de Puerto Rico.

En Colombia las especies más cultivadas son el la *Dioscorea alata* y la *Dioscorea rotundata*, estas dos son cultivadas una y otra vez utilizando material vegetal del mismo cultivo. Este proceso de propagación consecutiva sin ningún programa de mejoramiento trae consigo la degeneración genética de la planta. Por estas razones el cultivo ha tenido afectaciones por enfermedades como la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloesporioides* (Bustamante y Buitrago, 2006).

En la Universidad de Sucre, se realizaron estudios con ñames en peligro de extinción (*Dioscorea trifida* y *Dioscorea esculenta*) evaluando el efecto en el desarrollo y productividad de ambas especies utilizando variables de riego en la región de los Montes de María con zonas de clima cálido y medio (Acevedo, Salcedo & Sandoval, 2015).

Universidades como la de Córdoba han realizado estudios a nivel molecular de colecciones de ñame, un estudio realizado con marcadores AFLPs, determinaron la variabilidad genética de 20 accesiones de *Dioscorea* spp de manera intra e interespecífica (Rivera *et al.*, 2011). Bustamante y Buitrago (2006) con la finalidad de apoyar estrategias de mejoramiento y conservación utilizaron la técnica Selective Amplification Microsatellite Polimorphic Loci (SAMPL) para caracterizar variedades de ñame utilizados en el campo, así como ñames silvestres. Otro estudio usó la técnica DAF (DNA Amplificación Fingerprinting) para la caracterización de la colección de ñame de la Universidad de Córdoba y algunas muestras provenientes de IITA (Bustamante, Guzmán y Buitrago, 2003). El uso de AFLPs en 14 accesiones de la especie *D. alata* de esta colección, se realizó con el fin de evaluar la variabilidad genética y cómo se relaciona con la caracterización morfológica (Rivera *et al.*, 2012).

1.3. PERSPECTIVAS DEL ÑAME EN COLOMBIA

Colombia posee 57 especies de *Dioscorea*, 13 son endémicas y 4 son inducidas. En la región de la amazonia la *Dioscórrea trifida* ha sido la única especie domesticada en América. Investigadores de la Universidad Nacional, están realizando un listado de los ñames en Colombia para ampliar el muestreo de este género en la región neotropical y guiar la selección de especies para bioprospección (Agencia de Noticias UN, 2012).

La Universidad Córdoba realizó estudios en cuatro variedades de ñame para conocer las propiedades culinarias y de la industria de alimentos. Evaluó el ñame en fresco, en harina y en almidón, y contribuyendo con información sobre la composición en agua y grasa de dos variedades de ñame cocidos por proceso de freído por inmersión (Alvis *et al.*, 2008). Determinando que el ñame en fresco está construido fundamentalmente por agua y carbohidratos y que hay variación entre los ñames evaluados en cuanto a contenido proteico y humedad. Siendo una moderada fuente de energía que debe incentivarse el consumo.

Desde el año 2016 el Instituto Colombiano Agropecuario (Instituto Colombiano Agropecuario -ICA, 2107) vigila 500 hectáreas de ñame para una producción de calidad en 16 municipios del departamento de Córdoba, visitando 112 predios haciendo asistencias técnicas y colecta de muestras para realizar controles fitosanitarios. Lo mismo está realizando en el departamento de la Guajira en el municipio de Dibulla, haciendo actividades de verificación de predios destinados para la exportación de ñame espinoso y ñame criollo a los Estados Unidos.

Según la revista Dinero (2016), las exportaciones de ñame aumentaron un 477 veces con comparación con el año 2012, esto se debe a las propiedades del tubérculo. La empresa Sabana Produce S.A. exportó en el año 2015, 90 contenedores a los Estados Unidos, proyectándose para los años siguientes entre 200 y 500 contenedores al año. Las exportaciones son una buena proyección para

este cultivo, pues en países como Estados Unidos y regiones como la Unión Europea, concentran comunidades de latinos y africanos consumidores de este tubérculo. No obstante, se debe proteger el mercado interno, ya que este fruto es considerado alimento étnico.

En el año 2017 hubo una sobre-producción pasando de las diez mil hectáreas sembradas a más de 40 mil, esto se dio por el mejoramiento de la semilla y la producción de ñame más resistente a la antracnosis. Los avances obtenidos, responden al trabajo en conjunto del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (U.N.) Sede Bogotá y las universidades de Sucre y Córdoba (Agencia de Noticias UN, 2017).

Profundizar en el conocimiento de la diversidad genética de *Dioscorea* en Colombia, será una herramienta fundamental para el avance de su producción y proyección de consumo. En este sentido las técnicas moleculares son herramientas clave para su caracterización genética y en consecuencia discriminación de la misma.

2. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Existe una enorme necesidad de llevar a cabo trabajos de investigación para caracterizar la variabilidad genética de especies de ñame mantenidas por los agricultores tradicionales y especies silvestres, estimar su nivel de diversidad, así como también para desarrollar estrategias para la conservación y mantenimiento de esta diversidad. Por otro lado, un entendimiento profundo de las relaciones genéticas entre especies cultivadas y silvestres puede ayudar a la selección, y de esta manera incorporar diversidad genética en cultivares modernos y llevar a cabo la introgresión de genes para caracteres deseables.

De acuerdo con los avances realizados por la biotecnología en múltiples cultivos en

el mundo, y gracias a la cooperación internacional y al interés de varias instituciones de investigación acerca de la importancia del ñame para las comunidades principalmente de la costa atlántica colombiana, permitieron la caracterización morfológica y molecular de muchas de ellas, la aplicación de técnicas de cultivo de tejidos in vitro para obtención de semillas libre de patógenos y como mecanismos de variabilidad genética.

Este recurso biológico como alternativa alimentaria en la dieta de las poblaciones rurales carece de estudios para la región, lo que hace necesario investigar la variabilidad genética existente de *Dioscorea*, la caracterización de las especies cultivadas y silvestres, estimando el nivel de diversidad, que permitan futuros estudios para el desarrollo de estrategias de conservación y mantenimiento del ñame.

REFERENCIAS

Acevedo A., Salcedo J., & Sandoval I. (2015). Desarrollo y productividad de ñame (*Dioscorea trifida* y *Dioscorea esculenta*) en diferentes condiciones hídricas. *Acta Agronómica*, 64(1), 30- 35. doi:<https://doi.org/10.15446/acag.v64n1.43917>

Adejumo, B. A., Okundare, R. O., Afolayan, O. I., & Balogun, S. A. (2013). Quality attributes of yam flour (Elubo) as affected by blanching water temperature and soaking time. *International Journal of Engineering Science (IJES)*, 2(1), 216-221.

Agencia de Noticias, UN (2012). El país de los ñames: cultura y usos detrás del tubérculo. *Ciencia & Tecnología* No. 528. Recuperado de: <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/el-pais-de-los-names-cultura-y-usos-detras-del-tuberculo.html>

Agencia de Noticias, UN. (2017). Exitosa producción de ñame exige dinamizar mercado. Desarrollo rural. No. 463. Recuperado de: <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/exitosa-produccion-de-name-exige-dinamizar-mercado.html>

Aguilar R. (2012). Caracterización morfológica y molecular de la colección de *Dioscorea* spp. del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Trabajo de grado. Pag. 88.

Álvarez, A. (2000). Prácticas agronómicas para el cultivo del ñame. En: Ñame, producción de semilla por biotecnología. Editorial Unibiblos Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. p: 33-39.

Alvis, A., Vélez, C. & Rada, M. (2008). Composición de ñames frescos cultivados en Colombia y sometidos a freído por inmersión. *Información Tecnológica* 19:3-10.

Azofeifa, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17 (2), 221-241.

Balogun, M. (2009). Microtubers in yam germplasm conservation and propagation: The status, the prospects and the constraints. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 4 (1): 1-10.

Blanco, A., Tovar, J. & Fernández, M. (2004). Caracterización nutricional de los carbohidratos y composición centesimal de raíces y tubérculos tropicales cocidos, cultivados en Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 54(3):322-327.

Bressan, E. (2005). Diversidade isoenzimática e morfológica do inhame (*Dioscorea* spp.) coletados em roças de agricultura tradicional de Vale da Ribeira. S. P. Dissertação (Mestrado em Ecologia da Agroecossistemas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 172 p.

Bustamante S. & Buitrago G. (2006). Caracterización molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando Selective Amplification of Microsatellite

Polymorphic Loci. (SAMPL) en condiciones radioactivas. Colomb. Biotecnol. Vol. VIII N° 2. Pag 60 – 66.

Bustamante, S., Guzmán, M., & Buitrago, G. (2003). Caracterización molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando "DNA Amplificaron Fingerprinting (DAF)" en condiciones radiactivas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 5(2), 57-63.

Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/5e76/11116>

Cabrera, M., Gómez, R., Rayas, A., DeFeria, M., López, J., Medero V., Basail, M., Rodríguez G., & 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.

Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/15524/16404>

Camargo E. (2014). Introducción a los marcadores moleculares. Blogspot. Recuperado octubre 31 de 2016. <http://marcadoreseunice.blogspot.com.co/>

Castañeda C. (2015). Caracterización genética de palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jaq) mediante marcadores moleculares tipo RAMs. Trabajo de grado. Universidad de los Llanos.

Dansi, A., Dantsey, H., Dossou, I., N'Kpenu, K., Agré, P., Sunu, D., & Vodouhè, R. (2013). Varietal diversity and genetic erosion of cultivated yams (*Dioscorea cayenensis* Poir - *D. rotundata* Lam complex and *D. alata* L.) in Togo. *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 5(4), 223-239

Gale, D., (1994). Genetic markers, maps and wheat breeding. En J. R. Soc.. J. R. Agríe.

Gobernación de Bolívar, (2017). A disfrutar del festival del ñame en San Cayetano. Recuperado de: <https://www.bolivar.gov.co/index.php/item/1197-a-disfrutar-del-festival-del-name-en-san-cayetano>.

González, A., & Aguirre X., (2007). Las Herramientas Moleculares. Libro: Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). Cap 19. Pp 567-571.

González, M. (2012). El Ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 05-15. Recuperado en 21 de julio de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362012000400001&lng=es&tlng=es.

Hamon, P. y Toure, B. (1990). Characterization of traditional yam varieties belonging to the *Dioscorea cayenensis-rotundata* complex by their isozymic patterns. *Euphytica*. 46: 101 – 107.

Instituto Colombiano Agropecuario -ICA, (2017). En La Guajira, el ICA verifica requisitos de cultivo de ñame para exportación. Recuperado de: <https://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/En-La-Guajira-el-ICA-verifica-requisitos-de-cultiv.aspx>

Martin, W., Rhodes, M. (1977). Intra-specific classification of *Dioscorea alata*. *Trop. Agric.* 54:1-13.

Mignouna, D., y Dansi, A. (2003). Yam (*Dioscorea* spp.) domesticated by the Nago and Fon ethnic groups in Benin. *Gen. Res. Crop Evol.* 50: 519.

Ministerio del Poder Popular para la Agricultura y Tierras. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (2008). El estado de los recursos fitogenéticos. Segundo informe. Página 25-26.

Montaldo, A. (1991). Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Segunda edición rev. San José CR. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 408 p.

Muñoz, J., Morillo, A., y Morillo, Y. (2008). Microsatélites Amplificados al Azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agron*, 57(4), 219-226.

Otoo, E., Michael, A., Asare, P., & Tetteh. (2015). Molecular Categorization of Some Water Yam (*Dioscorea alata* L.) Germplasm in Ghana Using Microsatellite (SSR) Markers. *Journal of Agricultural Science*; Vol. 7, No. 10.

Ovono, O., Kevers, C., Dommès, J. (2007). Axillary proliferation and tuberization of *Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 91: 107-114.

Perea, M. (2000). Utilización de los sistemas in vitro para la obtención de plantas de ñame (*Dioscorea* spp) libres de patógenos. En: Guzmán, M. y Buitrago, G. (Ed). Ñame: producción de semilla por biotecnología. Unibiblos, Bogotá, p41-53.

Reina, Y. (2012). El cultivo de ñame en el Caribe colombiano. Documentos de Trabajo Sobre Economía Regional. Banco de la República. Número 168.

Rentaría, M. (2007). Las Herramientas Moleculares. Libro: Breve revisión de los marcadores moleculares. Cap. 18. pp 541-566.

Rieger, R. Michealis, & M. M. Green. (1982). Diccionario de Genética y Cito genética Clásica y Molecular.

Rincón, A., Araujo, C., Carrillo, F., & Martín, E. (2000). Evaluación del posible uso tecnológico de algunos tubérculos de las dioscoreas: ñame congo (*Dioscorea bulbífera*) y mapuey (*Dioscorea trifida*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(3), 286-290. Recuperado en 03 de abril de 2018, de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222000000300012&lng=es&tlng=pt.

Rivera, H., Álvarez, A., Palacio, J., Barrios, D., López, D. (2011). Diversidad genética intra e inter-específica de ñame (*Dioscorea* spp.) de la región Caribe de Colombia mediante marcadores AFLP *Acta Agronómica*, vol. 60, núm. 4, 2011, pp. 328-338.

Rivera, H., Álvarez, A., Palacio, J. & Ochoa, A. (2012). Caracterización molecular de accesiones de ñame (*Dioscorea alata* L.) de la región Caribe colombiana. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. 15(2): 323 – 330.

Revista Dinero, (05 de diciembre de 2016). El ñame conquista los mercados externos. Recuperado de: <https://www.dinero.com/edicion-impresa/negocios/articulo/la-demanda-del-name-ha-crecido-en-los-consumidores-de-estados-unidos/223537>

Silva L., Bajayn M., Monteiro M., Mezette, T., Nascimento, W., Zucchi M., Pinheiro J., & Veasey E. (2014). Isolation and characterization of microsatellites for the yam *Dioscorea cayenensis* (Dioscoreaceae) and cross-amplification in *D. rotundata*. Genetics and Molecular Research 13 (2): 2766-2771.

Siqueira M., Dequi, G., Corazon, G., Feltran J. & Veasey E. (2012). DNA fingerprinting of water yam (*Dioscorea alata*) cultivars in Brazil based on microsatellite markers. Horticultura Brasileira 30: 653-659.

Tamiru, M., Becker, H., & Maass, B. (2007). Genetic diversity in yam germplasm from Ethiopia and their relatedness to the main cultivated *Dioscorea* species assessed by AFLP markers. Crop Sci. 47: 1744 - 1753.

Universidad de Oxford. Sin fecha. *Dioscorea* species (Dioscoreaceae). Yam. Recuperado de: <http://herbaria.plants.ox.ac.uk/bol/plants400/Profiles/CD/Dioscorea>

USDA -United State Department of Agriculture. National Agricultural library. <http://www.nal.usda.gov>