

Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L.

Optimization of a culture medium for micropropagated plants of *Dioscorea alata* L.

Misterbino Borges García*, Reisel Destrade Batista**, Silvio Meneses Rodríguez*, Rafael Gómez Kosky***, Bernard Malaurie****, Perla Hamon**** y Louis Charles Demenorval*****

Resumen

La propagación de material de ñame de buena calidad es esencial para incrementar la producción sostenible de este cultivo. El presente trabajo tuvo como propósito optimizar el medio de cultivo de micropropagación de *Dioscorea alata* L. clon Caraqueño a través de los siguientes objetivos: determinar el efecto de diferentes antioxidantes (carbón activado 0,5 g/L⁻¹; carbón activado 1,0 g/L⁻¹; cisteína 10 mg/L⁻¹, 20 mg/L⁻¹ y 30 mg/L⁻¹) y concentraciones de sales de Murashige y Skoog (MS) (25, 50, 75 y 100 %) en el medio de cultivo durante el establecimiento y la multiplicación de las plantas *in vitro*, y evaluar la utilización de distintas combinaciones de ácido naftalenacético (0,01; 0,1 mg/L⁻¹) y bencilaminopurina (0,01; 0,1 mg/L⁻¹) en el mejor medio de cultivo de multiplicación obtenido en el experimento anterior. A los 35 días se seleccionaron 40 plantas *in vitro*, a las cuales se les determinaron las siguientes variables: longitud en cm del vástago; número de nudos *de novo* por explantes; número de hojas por explante y porcentaje de fenolización. Se evaluó además, en el experimento con los reguladores de crecimiento, el número de raíces y longitud de la raíz de mayor tamaño. Se aplicó un diseño experimental completamente aleatorio con análisis de varianza bifactorial y clasificación simple. Se realizó la prueba de comparación de medias de Tukey para un nivel de significación del 5%. Los resultados obtenidos mostraron que las sales MS al 75% de su concentración, el carbón activado (0,5 g/L⁻¹) o la cisteína (10 mg/L⁻¹), en combinación con los reguladores de crecimiento ANA/BAP (0,01/0,01 mg/L⁻¹) en el medio de cultivo MS, incrementaron los indicadores de desarrollo de las plantas *in vitro* tales como número de nudos *de novo* (3,5), longitud del vástago (4,1 cm), número de hojas (3,8), número de raíces (5,7) y longitud de las raíces (6 cm).

Palabras clave: ácido naftalenacético, bencilaminopurina, carbón activado, cisteína, ñame.

Abstract

The material propagation of good quality yam is essential to increase the sustainable production of this cultivation. In the present work the optimization of culture medium of *Dioscorea alata* L. clone Caraqueño micropropagation was carried out through the following objectives: to determine the effect of different anti-oxydants (activated charcoal 0,5 g.L⁻¹; activated charcoal 1,0 g.L⁻¹; cysteine 10 mg.L⁻¹, 20 mg.L⁻¹ and 30 mg.L⁻¹) and Murashige and Skoog salts concentrations (25, 50, 75 and 100%) in the culture medium during the *in vitro* plants establishment and the multiplication, and to evaluate the use of different combinations of naftalenacetic acid (0,01; 0,1 mg.L⁻¹) and benzylaminopurine (0,01; 0,1 mg.L⁻¹) in the best multiplication medium obtained in the above experiment. At 35 days, 40 *in vitro* plants were selected. The following vari-

* Centro de estudios de biotecnología vegetal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma. mborgesg@udg.co.cu.).

** Biofábrica Granman

*** Instituto de biotecnología de las plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

**** Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR DIAPC, F-34 000 Montpellier, France.

***** UMR-5253 ICGM Université de Montpellier 2, Montpellier, France

ables were determined in these plants: shoot length, cm; leaf and bud explant number; and oxydation phenolic percentage. In the experiment of plant growth regulators was also evaluated, the roots number and greater size root length. A totally randomized experimental design with one and two factor variance analysis and the Tukey test for means comparison at 5% significance level were applied. The obtained results showed that the salts MS at 75% concentration, the activated charcoal (0,5 g. L⁻¹) or the cysteine (10 mg. L⁻¹), in combination with the growth regulators ANA/BAP (0,01/0,01 mg.L⁻¹) in the MS culture medium, increase the development of the *in vitro* plants, number of *novo* buds (3,5), shoot length (4,1 cm), number of leaves (3,8), number of roots (5,7) and greater size root length (6 cm).

Key words: activated charcoal, benzylaminopurine, , naftalenacetic acid, cysteine, yam.

Recibido: marzo 7 de 2011

Aprobado: noviembre 30 de 2011

Introducción

Los ñames representan el 12% de la alimentación básica de los pueblos de las regiones intertropicales húmedas (Malaurie, 2001). El occidente de África suministra más del 90% de la producción mundial de ñame. Las zonas de cultivo y de la civilización del ñame se extienden desde Costa de Marfil hasta Camerún. Con una producción estimada de alrededor de 50 millones de toneladas por año, los ñames se sitúan en el cuarto rango en importancia a nivel mundial entre las plantas de raíces y tubérculos. Otras regiones productoras de importancia son el Sudeste de Asia, las islas tropicales en el Pacífico occidental y el Caribe. La producción mundial en el año 2008 se estimó en alrededor de 56,4 millones de toneladas (FAOSTAT, 2009).

En Cuba en los últimos años ha habido una tendencia a la disminución de la producción debido a que sobre el género *Dioscorea* ha incidido un alto riesgo de erosión genética a causa de diversos factores bióticos y abióticos, lo que ha ocasionado una drástica reducción del área cultivada donde casi la totalidad de la producción se deriva de agricultores individuales, mientras que la misma en el sector estatal es casi inexistente. De manera que una política agrícola inteligente y audaz basada en la combinación de métodos tradicionales con técnicas modernas podrían detener el deterioro de este género. En este sentido, una respuesta rápida puede ofrecerla la introducción de la micropropagación *in vitro* aplicada con éxito en diversos clones de ñame (Borges *et al.*, 2009).

Los primeros trabajos de micropropagación por segmentos nodales se llevaron a cabo con la formación de tubérculos aéreos a partir de segmentos nodales de *D. opposita* (Sawada *et al.*, 1958). De los ñames comestibles, *D. alata* ha sido empleada en la mayor parte de los trabajos (Mantell *et al.*, 1978; Arnolin, 1980; Mantell and Hugo, 1989; Belarmino and Rosario, 1991), después le siguen *D. rotundata* (Mantell

et al., 1978; Arnolin, 1980; Belarmino and Rosario, 1991), *D. bulbifera* (Uduebo, 1971; Mantell and Hugo, 1989), y *D. esculenta* (Belarmino and Rosario, 1991).

En Cuba a partir de 1990, dada la necesidad de incrementar el material de plantación de ñame de buena calidad, se comenzó a desarrollar la propagación acelerada de los principales clones comerciales de *D. alata*, a través de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales mediante la utilización de segmentos nodales. Se obtuvieron dos metodologías: De la Cruz *et al.* (1998) y Medero *et al.* (1999). La metodología de De la Cruz *et al.* (1998) utiliza básicamente el medio de cultivo D-571 (concentración media de sales), vitaminas de Murashige y Tucker (MT), 20 mg/L⁻¹ de cisteína, 30 g/L⁻¹ de sacarosa y sin hormonas, mientras que la metodología de Medero *et al.* (1999) usa el medio de Murashige y Skoog (MS) (concentración alta de sales), vitaminas de Morell, 0,1 mg/L⁻¹ de tiamina, 1 g/L⁻¹ de carbón activado, 30 g/L⁻¹ de sacarosa y reguladores del crecimiento, 1 mg/L⁻¹ de BAP y 0,1 mg/L⁻¹ de ANA. Con el empleo de estas metodologías se obtienen bajos coeficientes de multiplicación (2,5), sin embargo, deben ser optimizadas para su implementación en otros clones de interés agrícola y valor comercial en la región Oriental del país como el clon Caraqueño. Sobre este clon en los últimos 30 años ha incidido una alta erosión genética, debido al ataque de plagas y enfermedades mortales como los nemátodos y la antracnosis, que ha conducido a una disminución de los rendimientos agrícolas hasta 70% y a la desaparición del mismo en muchas localidades de la región (Borges *et al.*, 2009).

Teniendo en consideración lo antes expuesto, el presente trabajo tuvo como objetivos optimizar el medio de cultivo de micropropagación de *Dioscorea alata* L. en el clon Caraqueño a través de la evaluación de diferentes antioxidantes y concentraciones de sales MS

en el medio de cultivo durante el establecimiento y la multiplicación de las plantas *in vitro*, y la utilización de distintas concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y becilaminopurina (BAP) en el mejor medio de cultivo obtenido del experimento anterior para la propagación del material vegetal con altos índices de multiplicación.

Materiales y métodos

Influencia de diferentes antioxidantes en el medio de cultivo en el establecimiento y multiplicación de plantas in vitro

Este experimento tuvo como objetivo evaluar la influencia de diferentes antioxidantes y sus concentraciones en el medio de cultivo durante el establecimiento y la multiplicación de plantas *in vitro*, debido a que en las metodologías anteriores unos autores utilizan cisteína y otros carbón activado, no existe entonces un estudio integral al respecto.

Como material vegetal se utilizó en la fase de establecimiento segmentos uninodales primarios con una longitud de 15 mm, obtenidos de plantas donantes de ñame (*D. alata* L.) clon Caraqueño. Estas fueron cultivadas durante 35 días en condiciones semicontroladas (temperatura de 33 ± 2 °C, humedad relativa del 70-80% e iluminación natural con fotoperiodo de 12 horas). En la fase de multiplicación se emplearon segmentos uninodales con una longitud de 15 mm, procedentes de plantas *in vitro* cultivadas durante 35 días en la fase de establecimiento (primer subcultivo). Se utilizó un diseño completamente aleatorio con 100 plantas *in vitro* por tratamiento, los cuales consistieron en la utilización de distintos antioxidantes en el medio de cultivo Murashige and Skoog (1962) basal (MSB): 1: carbón activado 0,5 g/ L⁻¹; 2: carbón activado 1,0 g/ L⁻¹; 3: cisteína 10 mg/ L⁻¹; 4: cisteína 20 mg/ L⁻¹; 5: cisteína 30 mg/ L⁻¹ y 6: sin antioxidante (control).

A los 35 días, tanto en fase de establecimiento como en fase de multiplicación, se seleccionaron 40 plantas *in vitro* (de un total de 100 plantas *in vitro* por tratamiento con cuatro réplicas), a las cuales se les determinaron las siguientes variables: longitud del vástago en cm; número de nudos *de novo* por plantas; número de hojas por plantas (hojas extendidas totalmente) y porcentaje de fenolización (número de plantas con emisión de sustancias fenólicas).

Influencia de diferentes concentraciones de sales MS en el medio de cultivo en el establecimiento y multiplicación de plantas in vitro

Este experimento se realizó con la finalidad de determinar la influencia de distintas concentraciones de sales MS en el medio de cultivo MSB en el establecimiento y la multiplicación de plantas *in vitro*. Estudios similares no han sido realizados con anterioridad para el cultivo del ñame, donde el medio de cultivo de uso general hasta la fecha ha sido el MS al 100% de sus sales.

El material vegetal, el diseño, el muestreo y las evaluaciones realizadas, excepto la fenolización, se correspondieron con 2.1. Los tratamientos consistieron en distintas concentraciones de sales MS utilizadas en el medio de cultivo: 25, 50, 75 y 100% (control).

Efecto de diferentes concentraciones en el medio de cultivo MSB1C de ANA y BAP sobre la multiplicación de plantas in vitro

Como en las metodologías anteriores algunos autores no utilizan reguladores de crecimiento en el medio de cultivo del ñame y otros sí lo usan, no existe entonces un estudio definitivo al respecto. Por ello el presente experimento tuvo como propósito determinar el efecto en el mejor medio de cultivo obtenido de los experimentos anteriores 2.1 y 2.2 (MS al 75% de sus sales con cisteína 10 mg/L⁻¹, MSB1C) de diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y becilaminopurina (BAP) en la multiplicación de las plantas *in vitro* (tabla 1).

Tabla 1. Combinaciones de ANA y BAP en el medio de multiplicación de plantas *in vitro*

Tratamientos	ANA (mg/L ⁻¹)	BAP (mg/L ⁻¹)
1(control)	0	0
2	0,01	0
3	0,1	0
4	0	0,01
5	0,01	0,01
6	0,1	0,01
7	0	0,1
8	0,01	0,1
9	0,1	0,1

Se utilizó un diseño completamente aleatorio con arreglo bifactorial. El material vegetal, el muestreo y las evaluaciones coincidieron con lo descrito en el experimento anterior, excepto que se incorporaron el

número de raíces y longitud en cm de la raíz de mayor tamaño (desde la base hasta el ápice).

Análisis estadístico

Se aplicó un análisis de varianza bifactorial, para determinar la influencia de diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) y bencilaminopurina (BAP) en la multiplicación de plantas *in vitro*, y de varianza simple, para evaluar el efecto de diferentes antioxidantes y concentraciones de sales MS en el medio de cultivo durante el establecimiento y la multiplicación de plantas *in vitro*, con tres repeticiones por tratamiento. Para la comparación de las medias de los distintos tratamientos se utilizó la prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se procesaron con el paquete Estadística para WINDOWS, versión 8 (StatSoft, 2008).

Resultados y discusión

Influencia de diferentes antioxidantes en el medio de cultivo en el establecimiento y multiplicación de plantas *in vitro*

Los menores valores del porcentaje de fenolización y los mayores para la longitud del vástago, el número de nudos *de novo* y de hojas (tabla 2) se alcanzaron en el medio de cultivo donde se utilizaron diferentes antioxidantes, tanto en la fase de establecimiento como la de multiplicación de plantas *in vitro*, con relación al control (sin antioxidantes).

Estos resultados evidenciaron que los diferentes antioxidantes evaluados ejercieron un efecto fisiológico importante en el cultivo *in vitro* de ñame, ya que disminuyeron de manera efectiva la emisión de sustancias fenólicas dañinas para el material vegetal (Gratão *et al.* 2005; Azofeifa, 2007, 2009) y favorecieron significativamente el desarrollo de las plantas *in vitro* obtenidas de segmentos uninodales.

Resultados similares fueron alcanzados por Borges *et al.* (1999) durante el estudio de la adición de diferentes antioxidantes (cisteína 20 mg/L⁻¹, ácido cítrico, ácido ascórbico y polivinilpirrolidona 100 mg/L⁻¹) en el medio de micropropagación de ñame (*D. alata*). En los tratamientos donde se utilizaron las sustancias antioxidantes no se encontraron diferencias significativas para el porcentaje de fenolización, la longitud del vástago, el número de nudos *de novo* y de hojas.

Distintos autores han utilizado satisfactoriamente en el medio de micropropagación de ñame (*D. alata*), cisteína a razón de 20 mg/L⁻¹ (De la Cruz *et al.*, 1998; Salazar y Hoyos, 2007), 100 mg/L⁻¹ (Royero *et al.*, 2007) y carbón activado a concentraciones de 0,5 g/L⁻¹ (Borges y Sosa, 2007), 1 g/L⁻¹ (Medero *et al.*, 1999).

Influencia de diferentes concentraciones de sales MS en el medio de cultivo en el establecimiento y multiplicación de plantas *in vitro*

El efecto de diferentes concentraciones de sales MS en el medio de cultivo sobre el establecimiento y multiplicación de plantas *in vitro* de ñame se ilustra en la tabla

Tabla 2. Influencia de distintos antioxidantes en el medio de cultivo MSB en el porcentaje de fenolización y en los indicadores de desarrollo en la fase de establecimiento y multiplicación de plantas *in vitro* de *D. alata* clon Caraqueño a los 35 días de cultivo

T	Fase de establecimiento				Fase de multiplicación			
	F (%)	NN	LV(cm)	NH	F (%)	NN	LV(cm)	NH
1	0,61a (33,0)	2,4 a	2,3 a	3,0 a	0,58a (30,3)	2,4 a	2,7 a	3,6 a
2	0,62a (33,6)	2,3 a	2,4 a	3,1 a	0,61a (32,6)	2,5 a	2,6 a	3,7 a
3	0,63a (35,0)	2,4 a	2,3 a	2,8 a	0,62a (34,0)	2,5 a	2,8 a	3,5 a
4	0,61a (33,0)	2,3 a	2,4 a	2,7 a	0,61a (32,6)	2,4 a	2,6 a	3,8 a
5	0,62a (34,0)	2,4 a	2,2 a	2,6 a	0,61a (33,3)	2,6 a	2,7 a	3,7 a
6	1,00b (70,0)	1,6 b	1,2 b	1,7 b	1,03b (73,3)	1,8 b	1,2 b	2,2 b
EE	0,032	0,05	0,04	0,07	0,038	0,042	0,036	0,07

T: tratamientos; 1: 0,5 g/L⁻¹ de carbón activado; 2: 1 g/L⁻¹ de carbón activado; 3: 10 mg/L⁻¹ de cisteína; 4: 20 mg/L⁻¹ de cisteína; 5: 30 mg/L⁻¹ de cisteína; 6: sin antioxidantes (control). F: fenolización (dentro de paréntesis datos originales); NN: número de nudos *de novo*; NH: número de hojas; LV: longitud del vástago. Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente para p < 0,05 según prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. EE: error estándar.

3. El mejor tratamiento, significativamente diferente de los demás, correspondió al medio con una concentración de sales MS de 75% (tratamiento 3), a partir del cual se presentó una tendencia a la disminución de los parámetros de desarrollo a medida que disminuyó la concentración. Este resultado indicó, no solo una influencia negativa de las bajas concentraciones, muy probablemente por insuficiencia de nutrientes, sino también, que la concentración máxima resultó excesiva, lo cual permitió la preparación del medio de cultivo para la micropropagación de este clon con menor cantidad de reactivos que la recomendada en las metodologías anteriores.

Según la literatura revisada al respecto no se encontró ningún estudio similar para el cultivo del ñame. La mayoría de los autores han empleado el medio MS al 100% de sus sales para la micropropagación *in vitro* del ñame: Mantell *et al.*, (1978), Medero *et al.*, (1999), Royero *et al.*, (2007) y Cabrera *et al.* (2010), en *D. alata*; Mbanaso *et al.* (2007) en la tuberización *in vitro* de *D. rotundata*; Ondo Ovono *et al.* (2007) en la proliferación de yemas axilares y tuberización *in vitro* del complejo *D. cayenensis* - *D. rotundata*; Poornima and Ravishankar (2007) en la propagación *in vitro* de las especies silvestres *D. oppositifolia* and *D. pentaphylla* y Santacruz *et al.* (2005), en el uso, manejo y conservación *in vitro* de *Dioscorea spp.*

En general, Murashige (1982) planteó que el manejo de la concentración de las sales minerales es ampliamente recomendado para estimular el enraizamiento, formación de yemas, hojas y la longitud de las plantas *in vitro*, mientras que Piqueras and Debergh (2000)

señalaron que la concentración de sales minerales puede afectar la morfología de las plantas micropropagadas mediante cambios en la presión osmótica, los cuales afectan principalmente el desarrollo de las raíces *in vitro*.

Efecto de diferentes concentraciones de ANA y BAP en el medio de cultivo en la multiplicación de plantas *in vitro*

Los resultados mostraron que hubo un efecto sinérgico significativo de la interacción ANA/BAP. Adeniyi *et al.* (2008) obtuvieron resultados coincidentes al evaluar la interacción de estos reguladores de crecimiento en el medio MS durante la micropropagación de *D. alata* a partir de meristemas. Segura (2008) planteó que las interacciones sinérgicas entre auxinas y citoquininas son la base para explicar una serie de procesos fisiológicos, entre ellos la regulación de la división celular.

La mejor combinación fue 0,01 mg/L⁻¹ de ANA y 0,01 mg/L⁻¹ de BAP (tratamiento 5) (figura 1), que difirió significativamente para el número de nudos *de novo*, de raíces y la longitud de estas. Se presentó un efecto inhibitorio a partir de la concentración de 0,1 mg/L⁻¹ de BAP, sola y en combinación con ANA (tratamientos 7, 8 y 9) (tabla 4).

El valor de 2,8 nudos *de novo* obtenidos en el tratamiento 1 (sin adición de reguladores de crecimiento) es ligeramente superior al alcanzado en los trabajos de De la Cruz *et al.* (1998), Medero *et al.* (1999) y Saborit *et al.* (2001), en la micropropagación *in vitro* de *D. alata*, en un medio de cultivo sin la adición de reguladores

Tabla 3. Influencia de la utilización de distintas concentraciones de sales MS en los indicadores de desarrollo en la fase de establecimiento y multiplicación de plantas *in vitro* de *D. alata* clon Caraqueño a los 35 días de cultivo

T	Fase de establecimiento			Fase de multiplicación		
	NN	LV	NH	NN	LV	NH
1	2,3 b	2,3 b	3,0 b	2, 4 b	2,7 b	3,5 b
2	2,8 a	3,0 a	3,5 a	2,9 a	3,5 a	4,0 a
3	2,2 b	2,2 b	2,8 b	2,3 b	2,6 b	3,4 b
4	1,6 c	1,3 c	2,0 c	1,8 c	1,4c	2,6 c
EE	0,05	0,06	0,07	0,06	0,07	0,08

T: tratamiento; 1: sales MS al 100% (testigo); 2: sales MS al 75%; 3: sales MS al 50% y 4: sales MS al 25%. NN: número de nudos *de novo*; NH: número de hojas; LV: longitud del vástago. Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente para p<0,05 según prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. EE: error estándar.

Tabla 4. Efecto de la interacción de las combinaciones de ANA y BAP en el medio de cultivo MSB1C en la multiplicación *in vitro* de *D. alata* clon Caraqueño a los 35 días de cultivo

T	ANA (mg/L ⁻¹)	6-BAP (mg/L ⁻¹)	NN	LV (cm)	NH	NR	LR (cm)
1	0	0	2,8 bc	3,5 a	3,6 a	5,1 b	5,3 b
2	0,01	0	2,5 c	3,6 a	3,7 a	5,5 a	5,4 b
3	0,1	0	2,5 c	3,4 a	3,5 a	5,6 a	5 b
4	0	0,01	2,6 c	3,6 a	3,6 a	5 b	5,3 b
5	0,01	0,01	3,5 a	4,1 a	3,8 a	5,7 a	6 a
6	0,1	0,01	2,6 c	3,5 a	3,5 a	5,1 b	5,1 b
7	0	0,1	2,5 c	2,0 b	1,9 b	4,7 c	5 b
8	0,01	0,1	3,1 b	2,2 b	1,7 b	4,8 c	5,2 b
9	0,1	0,1	3,0 b	2,1 b	1,6 b	5,2 b	5,3 b
EE			0,02	0,02	0,03	0,03	0,02

T: tratamientos; ANA: ácido naftalenacético; 6-BAP: 6-bencilaminopurina; NN: número de nudos *de novo*; LV: longitud del vástago; NH: número de hojas; NR: número de raíces; LR: longitud de las raíces. Medias con letras distintas por columnas difieren significativamente para $p < 0,05$ según prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. EE: error estándar.

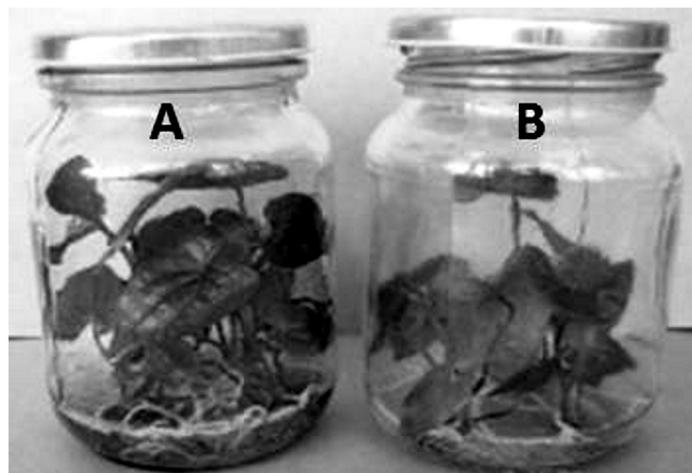


Figura 1. Aspecto de las plantas *in vitro* de *D. alata* clon Caraqueño en el medio de cultivo de multiplicación a los 35 días de cultivo. A) Medio MS al 75% + ANA 0,01 mg/L⁻¹ + BAP 0,01 mg/L⁻¹. B) Medio Control

de crecimiento, donde alcanzaron valores entre 2,5 a 2,6 para este indicador a los 35 días de cultivo.

Estos resultados no coinciden con los de Polo *et al.* (2003) en *D. alata*, quienes al evaluar la influencia de tres concentraciones de BAP (0,1; 0,2 y 0,3 mg/L⁻¹) en la formación de nudos *de novo* por plántulas, no encontraron diferencias estadísticas para las tres dosis y el testigo. Sin embargo, hay semejanzas con los resultados de Royero *et al.* (2007) en la micropropagación de *D. alata* basado en el uso de distintas combinaciones de ANA y BAP en el medio de cultivo, ellos obtuvieron los mayores valores para la longitud del vástago en el

tratamiento sin la adición de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo. También demostraron que el tamaño promedio de los brotes disminuyó cuando se aumentó la concentración de BAP.

La longitud del vástago conjuntamente con el número de nudos *de novo* constituyen los indicadores fundamentales en la micropropagación *in vitro* del ñame, lo que fue corroborado por Medero *et al.* (1999) y Saborit *et al.* (2001) en el monitoreo de la propagación *in vitro* de este cultivo a escala comercial.

Los mejores valores alcanzados para el número de raíces de las plantas *in vitro* de ñame a los 35 días de culti-

vo correspondieron a los tratamientos 2 (0,01 mg/L⁻¹ de ANA), 3 (0,1 mg/L⁻¹ de ANA) y 5 (0,01 mg/L⁻¹ de ANA + 0,01 mg/L⁻¹ de BAP), los cuales difieren significativamente del resto. Como se evidencia, los niveles de 0,01 y 0,1 mg/L⁻¹ de ANA y la más baja combinación de ANA/BAP (0,01 y 0,01 mg/L⁻¹) fueron los más adecuados para estimular el enraizamiento y la formación de nuevas raíces. Por otro lado, la longitud de las raíces mostró valores significativamente superiores con la combinación 0,01 mg/L⁻¹ de ANA y 0,01 mg/L⁻¹ de BAP.

Resultados similares fueron logrados por Royero *et al.* (2007) en la micropropagación de *D. alata*, con la utilización de distintas combinaciones de ANA y BAP en el medio de cultivo, donde se lograron un mayor número y longitud de las raíces con la disminución de la concentración de las sales del medio MS y la adición de 0,02 mg/L⁻¹ de ANA al medio de cultivo.

Por otra parte, otros autores han obtenido resultados no coincidentes en la utilización de la combinación más apropiada de ANA y BAP en el medio de cultivo de micropropagación *in vitro* del ñame, tales como: Mantell *et al.* (1991) (1 mg/L⁻¹ de ANA y 0,2 mg/L⁻¹ de BAP); Royero *et al.* (2007) (0,5 mg/L⁻¹ de ANA y 1 mg/L⁻¹ de BAP); Adeniyi *et al.* (2008) (0,001 mg/L⁻¹ de ANA; 0,05 mg/L⁻¹ de BAP y 0,1 mg/L⁻¹ de Kinetine) en *D. alata*, y Cabrera *et al.* (2003) (0,01 mg/L⁻¹ de ANA y 1 mg/L⁻¹ de BAP); Ezeibekwe *et al.* (2009) (0,5 mg/L⁻¹ de ANA y 0,2 mg/L⁻¹ de BAP) en *D. rotundata*, y Yan *et al.* (2010) (0,1 mg/L⁻¹ de ANA y mg/L⁻¹ de BAP) en *D. fordii*.

En general, los resultados de la presente investigación pudieran deberse a un contenido endógeno de hormonas de las yemas de segmentos uninodales de ñame, que unido a la adición de concentraciones muy bajas de los reguladores del crecimiento ANA y BAP (tratamiento 5), son suficientes para mejorar significativamente los indicadores fundamentales de la multiplicación y los demás indicadores de desarrollo de las plantas *in vitro*, como el número y longitud de las raíces, permiten prescindir de la fase de enraizamiento y, de esta forma, hacer más rápido y eficiente la micropropagación comercial de esta especie. En este sentido, Acosta *et al.* (2008) señalaron que los fitoreguladores constituyen un grupo de sustancias que, añadidas en cantidades muy pequeñas, modifican las pautas normales de desarrollo de las plantas y pueden ayudar a incrementar la productividad y mejorar la calidad del cultivo.

Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron que las sales MS al 75% de su concentración, el carbón activado o la

cisteína, en combinación con los reguladores de crecimiento ANA/BAP (0,01/0,01 mg/L⁻¹) en el medio de cultivo MS, incrementaron los indicadores de desarrollo de las plantas *in vitro*, tales como: número de nudos *de novo* (3,5); longitud del vástago (4,1 cm); número de hojas (3,8); número de raíces (5,7) y longitud de las raíces (6 cm). Este incremento es un aspecto esencial en la optimización de la fase de micropropagación de las plantas, pues redundante favorablemente a las fases subsiguientes de transferencia de las mismas a condiciones naturales, aclimatización y establecimiento en campo.

Agradecimientos

Esta investigación fue ejecutada exitosamente gracias al proyecto internacional *Fomento de la agricultura urbana y periurbana para la producción de alimentos en la provincia Granma, República de Cuba* financiado por la Diputación Foral de Bizkaia y la asociación Euskadi-Cuba. También fue posible por la capacitación científico-técnica recibida por el equipo de investigación IRD/CIRAD/UM II de Montpellier, Francia. A todos nuestros más sinceros agradecimientos.

Referencias Bibliográficas

- Acosta, M., Sánchez, J. y Bañón, M. 2008. Auxinas. En: J. Azcón-Bieto y Talón M. (eds). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Segunda edición. McGraw-Hill, S.A. Cartagena, Madrid, p. 377.
- Adeniyi, O. J., Adetimirin, V. O., Ingelbrecht, I. and Asiedu, R. 2008. Shoot and plantlet regeneration from meristems of *Dioscorea rotundata* Poir and *Dioscorea alata* L. *African Journal of Biotechnology* 7 (8): 1003-1008.
- Arnolin, R. 1980. Culture *in vitro* et amélioration de l'igname (*Dioscorea* spp.). L'igname, Séminaire International, Pointe-à-Pitre, INRA 255-268.
- Azofeifa, A. 2007. *Desarrollo de metodologías para la caracterización de materiales promisorios de jocote (Spondias purpurea L.) por medio de marcadores moleculares, para el rescate de embriones y para el cultivo de yemas in vitro*. Tesis Mg.Sc., Sistema de Estudios de Posgrado, Universidad de Costa Rica. 134 p.
- Azofeifa, A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía mesoamericana* 20 (1): 153-175.
- Belarmino, M. and Rosario, A. G. 1991. *Callus induction and organogenesis in Dioscorea Species*. *Japanese Journal of Breeding* 41: 561-569.
- Borges, M., Aguilera, N., Saborí, G. y Vázquez, J. 1999. Influencia de distintos antioxidantes en la micropropagación del ñame (*Dioscorea alata* L.). *Centro Agrícola* 26 (2): 69-71.
- Borges, M., Alarcón, Y., Malaurie, B., Hernandez, Y. y Silva, J. J. 2009. Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. clon Caraqueño. *Revista Peruana de biología* 16 (2): 20-25.

- Borges, M. y Sosa, Y. 2007. Efecto de la adición de diferentes concentraciones de carbón activado sobre la multiplicación *in vitro* de ñame. *Bioteología Vegetal* 8 (2): 87-90.
- Cabrera, M., Gómez, R., Rayas, A., De Feria, M., López, J., Medero, V., Basail, M., Rodríguez y 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): 6 p.
- Cabrera, M., Torres, Y., Santos, A., Basail, M., Rayas, A., Medero, V., Robaina, A., López, J., García, M., Ventura, J. C., Gutiérrez, V., Otero, E. y Bauta, M. M. 2003. Establecimiento y multiplicación *in vitro* del clon de Ñame blanco de Guinea (*Dioscorea rotundata* Poir). INIVIT. Villa Clara, Cuba. 7 p.
- De la Cruz, G., Borges, M., Aguilera, N., Saborit, G. y Labrada, M. 1998. Multiplicación acelerada del ñame (*Dioscorea alata* L.) en condiciones *in vitro*. Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de *Bioteología Vegetal*, La Habana, Cuba, p. 8.
- Ezeibekwe, I. O., Ezenwaka, C. L., Mbagwu, F. N. and Unamba, C. I. N. 2009. Effects of combination of different levels of Auxin (NAA) and Cytokinin (BAP) on *in vitro* propagation of *Dioscorea rotundata* L. (White Yam). *Journal of Molecular Genetics* 1 (2-4): 18-22.
- FAOSTAT. 2009. Disponible en: <http://www.fao.org>. Conectado el 7 de julio del 2009.
- Gratão, P. L., Polle, A., Lea, P. J. and Azevedo, R. A. 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32: 481-494.
- Malaurie, B. 2001. Medium and long term conservation and safe international exchange of germplasm from food and cash tropical crops. *Acta Horticulturae* 560: 69-77.
- Mantell, S. H., Haque, S. Q. and Whitehall, A. P. 1978. Clonal multiplication of *Dioscorea alata* L. and *Dioscorea rotundata* Poir. yams by tissue culture. *Horticultural Science* 53 (2): 95-98.
- Mantell, S. H., Hague, S. Q. y Chandler, F. L. 1991. Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el ñame. En: Roca, W. M. y L. A. Mroginski (eds): *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT, Colombia 2 p.
- Mantell, S. H. and Hugo, S. A. 1989. Effect of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinin on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 23-37.
- Mbanaso, E. N. A., Chukwu, L. I. and Opara, M. U. A. 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.
- Medero, V., Del Sol, L. y García, M. 1999. Metodología para la propagación del clon de ñame
- ´Blanco o Pelú´. Resúmenes del BioCat 99, Granma Cuba 5-7 de Octubre p. 12.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiological Plantarum* 15: 473-497.
- Murashige, T. 1982. Regeneration of plants. *California Agriculture* 36 (8): 19-20.
- Ondo Ovono, P., Kevers, C. and Dommes, J. 2007. Axillary proliferation and tuberisation of *Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata* complex. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 91: 107-114.
- Piqueras, A. and Debergh, P. C. 2000. Morphogenesis in micropropagation. In: *Morphogenesis in Plant Tissue Cultures*. Edited by Soh, W.-Y. and Bhojwani, S. S. *Kluwers Academic Publishers* pp. 443-462.
- Polo, J. M., Quintero, I. y Jarma, A. J. 2003. Efecto de bencilaminopurina en medio líquido sobre la tasa de multiplicación *in vitro* en *Dioscorea alata*. *Revista de divulgación científica. Universidad de Córdoba* 8 (1): 21-26.
- Poornima, G. N. and Ravishankar Rai, V. 2007. *In vitro* propagation of wild yams, *Dioscorea oppositifolia* (Linn) and *Dioscorea pentaphylla* (Linn). *African Journal of Biotechnology* 6 (20): 2348-2352.
- Royero, M., Vargas, T. E. y Oropeza, M. 2007. Micropropagación y organogénesis de *Dioscorea alata* (Ñame). *Interciencia* 32 (4) 11 p.
- Saborit, G. F., De la Cruz G., Meneses S. y Estrada, J. 2001. Efecto de algunos factores del ambiente *in vitro* en la multiplicación del ñame. *Revista alimentaria OCT XXXVIII* (326): 109-130.
- Salazar, R. y Hoyos, R. A. 2007. Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín* 60 (2): 3907-3921.
- Santacruz F., Casas, J. F., Pérez, R., Rodríguez, E. y Torres, M. I. 2005. Conservación, manejo y aprovechamiento de camote del Cerro (*Dioscorea* spp.) en el Estado de Jalisco. México. *Avances en la Investigación Científica en el CUCBA* pp. 179-183.
- Sawada, E., Yakuwa, T. and Imakawa, S. 1958. Studies on the formation of aerial tubers in chinese yam. II. On the aerial tuber formation in sterile culture of vine segments. *J. Hort. Assoc., Japan*, 27: 241-244.
- Segura, J. 2008. Citoquininas. En: J. Azcón-Bieto y Talón M. (eds). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Segunda edición. McGraw-Hill, S.A. Cartagena, Madrid, p. 421.
- StatSoft Inc. 2008. *Statistica for Windows*. Release 8. Tulsa. OK.
- Uduebo, A. E. 1971. Effect of external supply of growth substances on axillary proliferation and development in *Dioscorea bulbifera*. *Annals of botany* 25: 159-163.
- Yan, H., Yang, L. and Li, Y. 2010. Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 6 p.