

**Evaluación de la metodología de multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de ñame *Dioscorea sp.***

**Evaluation of the methodology for the multiplication *in vitro* of yam *Dioscorea sp.***

**Autores:** Enidia Téllez-Fuentes, Loexis Rodríguez-Montoya, Roberto González- Valladares\*

**Organismo:** Centro de Desarrollo de la Montaña, Limonar de Monte Ruz, El Salvador, Guantánamo, Cuba.

**E mail:** [enidia@cdm.gtmo.inf.cu](mailto:enidia@cdm.gtmo.inf.cu)

**Telef.** (021) 82206 – 82207 - 82209

**Resumen.**

El trabajo se desarrolló en el Centro de Desarrollo de la Montaña localizado en el municipio El Salvador, provincia Guantánamo, en el periodo comprendido entre marzo - diciembre/2010. Con el objetivo de lograr la multiplicación *in vitro* de ñame (*Dioscorea sp*) se realizaron varios experimentos en las diferentes fases de la micropropagación. Los resultados obtenidos en la desinfección de los segmentos nodales de ñame se logró con hipoclorito de sodio al 2.5 % durante 15 minutos con 60% de supervivencia. La concentración más efectiva de 6- BAP fue de 2.0 mg.L<sup>-1</sup>, alcanzó el mayor número de yemas por explante 2.9 y la longitud del tallo de 3.9 cm. La aclimatización de las vitroplantas se logró con el sustrato de pulpa café: arena (1:1) porcentaje supervivencia 95 % y altura 7.72 cm.

**Palabras clave:** micropropagación; *In Vitro*; Aclimatización.

**Abstrac.**

The work was developed in the Center of Development of the Mountain located in the municipality El Salvador, county Guantánamo, in the period understood among March - Diciembre/2010. With the objective of achieving the multiplication *in vitro* of yam (*Dioscorea sp*) they were carried out several experiments in the different phases of the micropropagación. The results obtained in the disinfection of the nodal segments of yam were achieved with hipoclorito of sodium to 2.5% during 15 minutes with 60% of survival. The most effective concentration in 6 - BAP was of 2.0 mg.L<sup>-1</sup>, I reach the biggest number of yolks for explante 2.9 and the longitude of the shaft of 3.9 cm. The acclimatization of the vitroplantas it was achieved with the sustratum pulp coffe: sand (1:1), percentage survival 95% and height 7.72 cm..

**Keywords:** Micropropagation; In Vitro; Acclimatization.

## Introducción.

El ñame pertenece al género *Dioscorea*. Sus tubérculos se utilizan como fuente ya sea de carbohidratos o ya de compuestos medicinales del grupo de los esteroides. El ñame se cultiva en la región del Caribe como una fuente de carbohidratos. Las principales especies cultivadas son: *Dioscorea alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. esculenta*, *D. bulbifera* y *D. trifida*. Cada especie posee sus propios atributos que se expresan en las características de producción del tubérculo en su textura y sabor en la cocción. *D. alata*, uno de los ñames más populares del Caribe se propaga vegetativamente mediante partes del tubérculo (Mantell *et al.*, 1994 y FAOSTAT., 2010)

El ñame en Cuba se cultiva tradicionalmente en las regiones oriental y central del país. En este cultivo los tubérculos subterráneos son la parte útil de la planta, tanto para el consumo, como semilla para la próxima siembra. Esta especie desde que comenzó a explotarse por el hombre, se viene propagando de forma agámica por fracciones de tubérculos, las que al sembrarse de un año para otro en campo pueden ir acumulando microorganismos. Un programa de rescate y producción de semillas de calidad por técnicas biotecnológicas es necesario para incrementar las áreas de producción del cultivo. (Cabrera *et al.*, 2004)

En el macizo montañoso Nipe- Sagua- Baracoa donde se albergan un total de 15 accesiones de ñame que incluyen 6 de las 8 especies de mayor importancia económica perteneciente al género *Dioscorea*, la situación agroecológica se caracteriza porque la biodiversidad de clones de ñame es muy pobre a pesar de su real existencia en las localidades; en este caso se destacan el ñame guinea, filipino, cush cush y pelú, esta misma situación la presenta la malanga donde los clones amarillos a pesar de presentar mayor calidad nutricional e índice de multiplicación son los menos diversificados.

Por todo lo anteriormente expuesto este trabajo estuvo encaminado a la evaluación de la metodología de multiplicación *in vitro* de segmentos nodales ñame *Dioscorea sp.*

## Desarrollo.

### Materiales y Métodos

La investigación se desarrolló en el Centro de Desarrollo de la Montaña, localizado en Limonar de Monte Ruz, municipio El Salvador ubicado a 420 msnm en el macizo Montañoso Nipe-Sagua-Baracoa durante el periodo de marzo - diciembre/2010.

El instrumental utilizado en el manejo del material vegetal se esterilizó en estufa a 180°C durante 150 minutos, las operaciones de inoculación y transferencia se realizaron en una cabina de flujo laminar horizontal FASTER, donde el instrumental se sumergió en etanol al 90% y se flameó con mechero de gas.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  y  $1.2 \text{ Kg.cm}^{-2}$  de presión durante 20 minutos, previo a este proceso el pH del medio se ajustó a  $5,7 \pm 0.01$ . Para los experimentos de establecimiento se utilizaron tubos de cultivo (120 x 20 mm) con 5 mL de medio de cultivo en cada caso. Sin embargo los experimentos de multiplicación se realizaron en frascos de cultivo de vidrio de 250 mL de capacidad con 25 mL de medio de cultivo solidificado ( $6.0 \text{ g.L}^{-1}$  de agar técnico No. 3).

El material vegetal se incubó en un cuarto de luz natural y artificial con lámparas fluorescentes para el control del fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad luminosa de aproximadamente 3000 a 4000lux ( $37.5\text{--}50.0 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), la temperatura de  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa de 75-85 %.

#### Análisis experimental y estadístico empleado

Para el trabajo a nivel de laboratorio y casa verde el diseño empleado fue completamente aleatorizado. En el procesamiento estadístico de los resultados se emplearon las pruebas estadísticas de Kolmogorov-Smirnov y el Test Levene para comprobar los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianza de los datos respectivamente. De cumplirse estos supuestos, se utilizaron las pruebas paramétricas de Análisis de Varianza (ANOVA) y Tukey HSD. En todos los casos se utilizó el procesador estadístico Statgraphic Plus versión 5.1 y para la graficación de los resultados el Microsoft Excel 2000.

#### Fase de establecimiento

Evaluación de una concentración y tres tiempos de desinfección de  $\text{NaClO}$  para el establecimiento in vitro de los segmentos nodales.

#### Material Biológico.

Como material se utilizó semilla que fueron cultivadas de forma aislada en casa de cristal, desinfectados superficialmente con detergente. El sustrato fue desinfectado con fórmol al 5 % y luego de 72 horas fue lavado con  $\text{H}_2\text{O}$  corriente procedimiento se realizó según lo propuesto por la metodología de Mederos *et al*, 1997.

Las guías vegetativas se cortaron hasta los 10 primeros segmentos nodales, utilizando una tijera desinfectada (alcohol 70%), las seleccionadas fueron llevadas al laboratorio donde se dividieron en secciones de aproximadamente 3 cm. de longitud y previendo que la yema axilar quede ubicada en el centro de cada una de estas.

**Tabla 1.** Diferentes procedimientos para la desinfección de los segmentos nodales de *Dioscorea sp.*

Tratamientos	NaClO (2.5%)	H <sub>2</sub> O Destilada Estéril	Solución Cisteína (50mg. L <sup>-1</sup> )
I (Testigo)	10 min	3 lavados	-
II	15min	3 lavados	Si
III	20min	3 lavados	Si

El testigo se corresponde con lo que se describe en la metodología de Mederos *et al.*, 1997. Los lavados con agua destilada estéril se realizaron a intervalos de 5 minutos.

Con el auxilio de pinzas, bisturí y sobre una placa petri, se colocó el material desinfectado y se reduce el tamaño hasta 1.0 cm. de longitud aproximadamente; La microestaca se introduce con una pinza en un tubo de cultivo que contenga un caldo nutritivo formado por las sales MS (1962), suplementado con las vitaminas de Morell o 1 mg L<sup>-1</sup> de tiamina, con 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, 1 mg L<sup>-1</sup> de 6 -BAP, 0.01 mg.L<sup>-1</sup> de ANA, 6 g.L<sup>-1</sup> de agar técnico No.3 y pH 5.7 ± 0.01.

Los tubos sembrados se colocan en cuartos de cultivo con las características que se describe en los procedimientos generales.

#### *Muestreo y evaluación.*

Los muestreos se realizaron a los 28 días de inoculación en el medio de cultivo. Las variables evaluadas fueron:

- Porcentaje de supervivencia (%).
- Porcentaje de contaminación (%).
- Porcentaje de fenolización (%).
- Inicio de la brotación (días).

#### **Fase de multiplicación**

Efecto de diferentes concentraciones de 6- BAP en la multiplicación in vitro de ñame

En esta segunda fase los explantes fueron subcultivados en un medio que contiene las sales MS (1962) (suplementado con las vitaminas Morell ó 1 mg L<sup>-1</sup>, 1 g.L<sup>-1</sup> de carbón activado ó 20 mg L<sup>-1</sup> de cisteína, con 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarosa, concentraciones de 6 -BAP (0(testigo); 1.0; 1.5 y 2.0 mg.L<sup>-1</sup>), gelificado con 7 g.L<sup>-1</sup> de agar – agar y pH 5.7 ± 0.01, en pomos de 250 ml, durante 25 ± 5 días bajo las mismas condiciones de temperatura e intensidad luminosa.

#### Muestreo y evaluación.

Los muestreos se realizaron a los 28 días de inoculación en el medio.

Las variables evaluadas fueron:

- Número de entrenudos (yemas) por explante
- Longitud del tallo (cm.)

### Fase de enraizamiento

En la metodología descrita por Mederos *et al.* (1997) se plantea que la fase de enraizamiento o etapa de pre-trasplante; facilita la obtención de plántulas autotróficas que pueden sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo. Para la inducción del sistema radicular, se dividen las plántulas en microestacas de 2 a 3 segmentos nodales, colocándose de 4 a 6 por frascos que contengan un medio con el 50% de las sales MS y suplementado con 15 g/L de sacarosa, 0.1 mg/L de AIB, sin vitaminas y gelificado con 7 g/L de agar-agar o en estado líquido, según proceda.

### Fase de aclimatización

Efecto de diferentes sustratos en la aclimatización de vitroplantas de ñame.

Para la adaptación de las vitroplantas de ñame se utilizó la metodología propuesta por Mederos *et al.* (1997).

Extraer con pinzas las vitroplantas y lavar con agua corriente hasta la eliminación total de los residuos de agar y medio de cultivo. Plantar sobre unos sustratos que se muestran a continuación, desinfectarse con una solución de formalina al 5 % a razón de 5 L/m. Mantener con riegos ligeros la humedad óptima en las vitroplantas y limpiar de malezas hasta el trasplante final al campo.

Tratamiento 1. Pulpa de café: suelo (1:1)

Tratamiento 2. Pulpa de café: arena lavada (1:1)

Tratamiento 3. Pulpa de café: arena lavada (3:1)

Tratamiento 4. Suelo: humus de lombriz: arena lavada (2:1:1)(Testigo)

Se realizaron análisis químicos y físicos a los sustratos según los métodos mencionados anteriormente.

En las **tablas 2 y 3** se muestran los resultados de los análisis químicos y físicos de los sustratos empleados para la aclimatización de vitroplantas de ñame, estando los valores de cada una de los parámetros analizados.

**Tabla 2.** Características agroquímicas de los sustratos empleados en la adaptación de vitroplantas de ñame.

Sustrato	pH (H <sub>2</sub> O)	M.O.(%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg/100g)
Pulpa de café : suelo (1:1)	7.4	4.72	11.17
Pulpa de café : arena (1:1)	6.7	3.98	9.75
Pulpa de café : arena (3:1)	6.8	4.12	10.12
Suelo : H.L: arena lavada (2:1:1)	7.5	4.72	11.17

**Tabla 3.** Propiedades físicas de los sustratos empleados en la adaptación de vitroplantas de ñame.

SUSTRATO	D.A <sup>1</sup> (g/cm <sup>3</sup> )	D.R <sup>2</sup> (g/cm <sup>3</sup> )	P.T <sup>3</sup> (%)	P.A <sup>4</sup> (%)	C.C <sup>5</sup> (%)
Pulpa: suelo(1:1)	0.46	2.20	79.10	20.37	34.8
Pulpa :arena(1:1)	0.71	2.52	71.83	33.24	25.01
Pulpa :arena (3:1)	0.48	2.55	81.18	24.32	30.5
Suelo: H.L:arena lavada (2:1:1)(Testigo)	0.5	2.65	75.61	28.20	19.20

#### Leyenda

1. D. A.- Densidad aparente.
2. D. R.- Densidad real.
3. P. T.- Porosidad total.
4. P. A. -Porosidad de aireación.
5. C. C. -Capacidad de campo.

#### Muestreo y evaluación.

Los muestreos se realizaron a los 15, 30 y 45 días de la plantación .Se determinó la altura de la planta (cm.), el número de raíces y porcentaje de supervivencia.

### Resultados y discusión

#### Fase de establecimiento

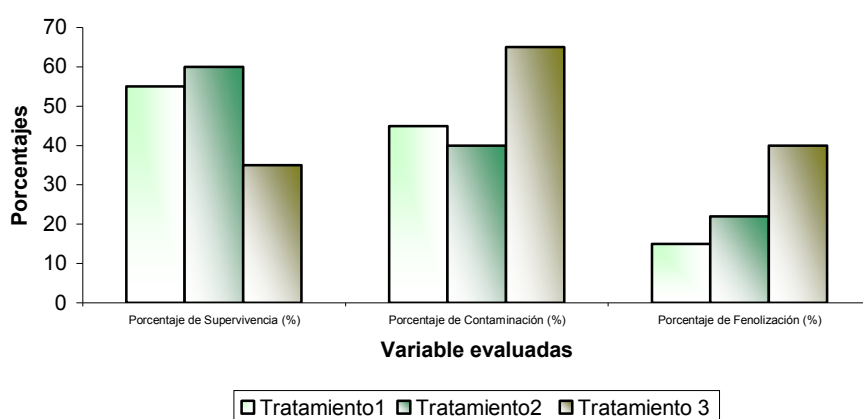
Desinfección de los segmentos nodales de ñame para el establecimiento in vitro

Los resultados mostrados en la Figura 1 reflejan que entre el tratamiento 2 y el resto de los tratamientos hay diferencias significativas, la desinfección propuesta por Mederos *et al.* (1997) obtuvo un 55% de porcentaje de supervivencia, la desinfección NaClO (2.5 %) durante 10 min. y el tratamiento donde se utiliza NaClO (2.5 %) durante 15 min., logró un 60 %.

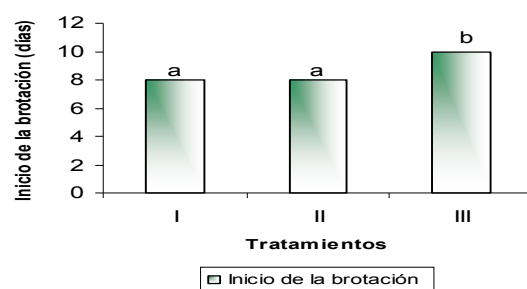
Aunque en algunos casos se plantea incluir el efecto combinado del Etanol al 70 % con el hipoclorito de sodio entre 1.0-2.5 %, para este cultivo no se procedió a la utilización de ambos porque son sustancias altamente oxidantes y el ñame contiene gran cantidad de fenoles que cuando se realiza un corte (heridas) al explante llega a expulsar al medio de cultivo, por lo que ocurre un oscurecimiento y eventual muerte de los explantes.

En cuanto al porcentaje de fenolización, en los dos tratamientos donde se utiliza NaClO (2.5 %) durante 15 min y 20 min, respectivamente, los valores están entre 25% para el primer caso y 40% para el segundo, lo que demuestra que es proporcional el tiempo de inmersión en el hipoclorito de sodio y la fenolización de los segmentos nodales por lo que hay una incidencia en la fenolización.

En cuanto al inicio de la brotación no hubo diferencia significativa entre los tratamientos I y II (8 días), no así para el tratamiento III que fue de 10 días (Figura 2)



**Figura 1.** Efecto de los diferentes procedimientos de desinfección de los segmentos nodales de ñame en las variables evaluadas en el porcentaje de supervivencia, contaminación y fenolización, a los 28 días de cultivo. Los datos representan las medias para N=20. Medias con letras desiguales difieren significativamente. ANOVA simple para  $p < 0.05$ ; Duncan para  $p < 0.05$  para cada variable de manera independiente: I ( NaClO 2.5% 10min); II (NaClO 2.5 % 15min , NaClO 2.5% 20 min.).



**Figura 2.** Influencia de los diferentes procedimientos de desinfección en el inicio de la brotación de los segmentos nodales de ñame. *Letras distintas difieren estadísticamente* ( $p < 0.05$ ). Medias con letras desiguales difieren significativamente. ANOVA simple para  $p < 0.05$ ; Duncan para  $p < 0.05$  para cada variable de manera independiente: I (NaClO 2.5% 10min); II ( NaClO 2.5% 15 min) y III (NaClO 5% 20min).

### Fase de multiplicación.

Efecto de diferentes concentraciones de 6- BAP en la multiplicación *in vitro* de ñame.

En la Tabla 4 se muestran los resultados de la multiplicación *in vitro* de ñame, en trabajos anteriores se plantea la no utilización de hormonas en esta fase Mederos *et al* (1997), en los experimentos evaluados los mejores resultados se obtuvieron utilizando el 6-BAP en un rango de concentración de  $1.5 - 2.0 \text{ mg.L}^{-1}$ , por lo que demuestra que para el caso específico del clon filipino es necesario la utilización exógena de citoquinina o la combinación de esta con una auxina, para lograr una mayor tasa de multiplicación.

En otros trabajos realizados Cabrera *et al.*, 2004, propone la utilización en el medio de cultivo complementado de  $1.0 \text{ mg. L}^{-1}$  de ácido naftalenoacético (ANA) y  $0.2 \text{ mg. L}^{-1}$  de 6-bencilaminopurina (6- BAP). Si no se añaden estos reguladores del crecimiento, los explantes se decoloran y dejan de crecer 60 días después de la excisión.

**Tabla 4.** Efecto de diferentes concentraciones de 6 - BAP sobre las variables evaluadas en la fase de multiplicación *in vitro* en ñame.

Tratamientos [6 -BAP] ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	N yemas por explante.	Número de Lo	Longitud del tallos (cm)
0	1.0 d		1.6 d
1.0	1.9 c		2.8 c
1.5	2.4 b		3.4 b
2.0	<b>2.9 a</b>		<b>3.9 a</b>
M.G±EE	2.05±0.1		2.92±0.1

*Letras iguales no difieren entre sí de acuerdo al test de studen* ( $p < 0.05$ )

### Fase de enraizamiento.

La fase de enraizamiento *in vitro* se logró en la misma fase de multiplicación por lo que sugerimos no preparar un medio específico para esta.



## Fase de aclimatización.

Efecto de diferentes sustratos en la aclimatización de vitroplantas de ñame.

En la fase *ex vitro* se emplean sustratos enriquecidos, con el fin de brindarle a las plántulas los nutrientes y la humedad necesaria para su adaptación, con el objetivo de obtener plantas resistentes al estrés producidos por el trasplante a la plantación definitiva empleándose como abonos orgánicos el estiércol vacuno, la cachaza, compost y el humus de lombriz (De la Noval, 1997). Sin embargo, son pocos los trabajos que han incursionado con el uso de la pulpa de café como sustrato en la fase de adaptación de vitroplantas.

La habilidad para que las plantas producidas *in vitro* sobrevivan el período de transición, puede ser una limitante para el uso comercial del cultivo de tejidos vegetales; sin embargo, sabemos que algunas especies se adaptan más fácilmente que otras (Granada, 1990).

La fuente tradicional de producción de materia orgánica ha sido la explotación ganadera, empleándose como componentes de sustratos de cultivo, que hoy en día se han transformado en ocasiones en un problema ambiental, implicando una correcta gestión de los residuos, debido a las concentraciones en explotaciones intensivas

La utilización de la pulpa de café como abono orgánico en cepellos produjo un efecto positivo sobre el establecimiento y desarrollo de las vitroplantas de ñame en la fase *post in vitro*. Al analizar los parámetros longitud del tallo y número de hojas (Tabla 5) se encontró diferencias significativas entre los tratamientos utilizados, correspondiéndole al sustrato pulpa de café: arena (1:1) los mejores resultados, con un índice de supervivencia de 95%, Mederos *et al.* (1999) encontró similar índice de supervivencia (95%) en vitroplantas de ñame con otro sustrato (mezcla de tierra: arena: materia orgánica)

**Tabla 5.** Resultados de los diferentes sustratos en la aclimatización de vitroplantas de ñame las variables evaluadas.

Sustratos	Variables		
	L.T. <sup>1</sup> (cm)	N.H. <sup>2</sup>	P.S. <sup>3</sup> (%)
Pulpa. Café: suelo (1:1)	6.46 b	7.21 b	89
Pulpa. café: arena (1: 1)	<b>7.72 a</b>	<b>9.35 a</b>	<b>95</b>
Pulpa. café: arena (3:1)	5.85 b	6.78 b	72
Suelo:H.L:arena (2:1:1)(Testigo)	lavada 6.79 b	7.71 b	89
Es	1.28*	3.25*	

Letras iguales no difieren entre sí de acuerdo al test de studen ( $p < 0.05$ )

1. L.T.- Longitud del tallo.
2. N.H.- Número de hojas.
3. P.S.- Porcentaje de supervivencia.

## Conclusiones.

- La desinfección de los segmentos nodales de ñame con hipoclorito de sodio al 2.5 % durante 15 minutos, obtuvo los mejores resultados con 60% de supervivencia.
- La concentración más efectiva de 6- BAP fue de  $2.0 \text{ mg.L}^{-1}$ , en que se alcanzó el mayor número de yemas por explante 2.9 y la longitud del tallo de 3.9 cm.
- La aclimatización de las vitroplantas se logró con el sustrato de pulpa. café: arena (1: 1) porcentaje supervivencia 95 % y altura 7.72 cm.

## Bibliografía.

- Agramonte, D. (1998). Aclimatización. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. *J. N. Pérez Ponce*, 193-202.
- Borroto, G. (2001). *Seguridad alimentaria, semillas y biotecnología: El caso de Cuba. IV Evento Latinoamericano de Biotecnología Vegetal: Biodiversidad y Biotecnología al servicio de la vida.*
- Cabrera, M. R., A; Torres, Y; Otero, E; Santos, A; Medero, V; López, J; Basail, M y García, M. (2004). *Metodología para micropropagación del clon 'Blanco de Guinea'.*
- De la Noval, B., María I. Hernández y J.C. Hernández. (1997). Utilización de las micorrizas arbusculares en la adaptación de vitroplantas de banano (*Musa sp.*): Dosis y cepas de hongos formadores de micorrizas arbusculares (HFMA) y combinaciones de sustratos. *Cultivos Tropicales*, 18(3), 5-9.
- Krikorian, A. D. E. R. W. M. y L. A. M. (1993). Medios de cultivos: generalidades, composición y preparación. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, 41-77
- Mantell, S. H., S.Q. Haque y F.L. Chandler. (1994). Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el ñame. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, 481-494.
- Mederos, V. G., M; López, J; Ventura, J y Rodríguez, S (1997). *Metodología para la propagación in vitro del ñame.*
- Milián, M. y C., A. (2001). *Instrucciones técnicas para el cultivo del ñame.*
- MINAGRI. (1998). *Instructivo Técnico de Ñame.* Cuba.
- Mroginski, L. A., Roca, L.A. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. *Cultivo de Tejidos en la Agricultura.*, 19-40.

**Fecha de recibido: 22 jun. 2012**  
**Fecha de aprobado: 14 sep. 2012**