

Multiplicación *in vitro* de segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*) en sistemas de cultivo semiautomatizado

“Blanco de Guinea” (*Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*) yam clone *in vitro* nodal segment multiplication in a temporary immersion system

Manuel Cabrera Jova¹, Rafael Gómez Kosky², Sergio Rodríguez Morales¹,
Jorge López Torres¹, Aymé Rayas Cabrera¹, Milagros Basail Pérez¹, Arletys Santos Pino¹,
Victor Medero Vega¹, Germán Rodríguez Rodríguez¹

Resumen

Con el empleo del sistema de inmersión temporal fue posible incrementar la multiplicación *in vitro* de los segmentos nodales en el clon de ñame Blanco de Guinea. Con este tipo de sistema de cultivo se obtuvieron los más altos valores para la altura de la planta, número de entrenudos por planta, así como para la masa fresca y seca de las mismas. Las condiciones de cultivo creadas en el sistema de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de los segmentos nodales lograron el más alto coeficiente de multiplicación (8,50), así como redujeron el número de plantas con síntomas de vitrificación (3,30). Las plantas cultivadas en este tipo de sistema de cultivo se caracterizaron por el mayor crecimiento de los segmentos nodales, coloración verde y hojas más desarrolladas. La utilización de este tipo de sistema de cultivo en la fase de multiplicación *in vitro* de los segmentos nodales posibilitará incrementar el empleo de la micropropagación para la producción de semilla en el complejo *Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*.

Palabras clave: sistema de inmersión temporal, medio líquido, micropropagación.

Abstract

‘Blanco de Guinea’ yam clone nodal segment multiplication was increased by using the temporary immersion system (TIS). The highest values for plant height, internodal number per plant and fresh and dry weight were obtained in this culture system. Nodal segments cultivated in TIS produced the highest multiplication coefficient (8,50). These plants were characterised by their green colour and rapid growth. The number of plants having vitrification symptoms (3,30) became reduced due to the favourable culture conditions crea-

1 Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (Inivit), Villa Clara, Cuba. mcabrera@inivit.co.cu

2 Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

ted in the TIS. It is recommended that nodal segment multiplication in TIS be include in the available micropropagation protocols for *Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata* to decrease propagation/production costs.

Key words: temporary immersion system, liquid medium, micropropagation.

Recibido: abril 9 de 2008

Aprobado: noviembre 25 de 2008

Introducción

El cultivo del ñame (*Dioscorea* spp.) contribuye a los requerimientos energéticos y de nutrición de una gran parte de las poblaciones en los países en desarrollo, y lo continuará siendo en las próximas décadas (Craufurd et ál., 2006). Este cultivo se adapta a una amplia gama de usos: alimentos básicos (para consumo fresco y en forma procesada), alimento animal y como materia prima para fines industriales.

Además, es considerado el segundo cultivo en eficiencia para producir energía digestible, solamente superado por la papa (Ondo et ál., 2007). La producción anual mundial se estima en alrededor de 51,4 millones de toneladas (Faostat, 2006).

Dentro de las más de 600 especies del género *Dioscorea*, el complejo de especie *Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata* es uno de los más cultivados en Cuba y en el mundo (Minagri, 2004).

En este cultivo los tubérculos subterráneos constituyen la parte útil de la planta, tanto para el consumo, como para obtener la semilla. Desde que se comenzó a explotar por el hombre, esta especie se viene propagando de forma agámica por tubérculos enteros o secciones de tubérculos. Este tipo de semilla, al plantarse de un año para otro en campo, se puede infestar por microorganismos patógenos y perder su calidad (Tschannen et ál., 2005).

La micropropagación en el cultivo de ñame ha estado dirigida, a nivel mundial, básicamente para solucionar problemas de enfermedades virales (Lebas, 2002; González, 2006). Sin embargo, los protocolos desarrollados para la micropropagación en *Dioscorea cayenensis* - *D.*

rotundata se han caracterizado por el empleo de medios de cultivo semisólidos y por la utilización de frascos de cultivo de tamaño convencional, lo cual restringe las posibilidades de la automatización de la multiplicación (Maurie et ál., 1995; Ondo et ál., 2007). Éstas han sido algunas de las causas del lento crecimiento y pobre multiplicación de los segmentos nodales, limitando el uso comercial de la micropropagación para la producción de semilla, debido a los relativos altos costos para la obtención de los propágulos (Perea, 2001; Balogun et ál., 2006).

Con el objetivo de incrementar el empleo de la micropropagación para la producción de semilla en el complejo *Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*, se evaluó el efecto de dos sistemas de cultivo semiautomatizados sobre la multiplicación *in vitro* de los segmentos nodales en el clon de ñame Blanco de Guinea.

Materiales y métodos

Material vegetal

Se emplearon como explantes segmentos nodales con una yema axilar del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*) certificados como libres de enfermedades virales, en tercer subcultivo, procedentes del Banco de Germosplasma *in vitro* de la especie que conserva el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (Inivit); ubicado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba.

Se utilizó como medio de cultivo basal las sales inorgánicas y vitaminas propuestas por (MS), con cisteína (20 mg/L⁻¹). El pH fue ajustado a 5,7 con NaOH 0,5 N o HCl 0,5 N antes de la esterilización por 20 minutos en autoclave vertical (BK75).

En cada sistema de cultivo fueron colocados 50 segmentos nodales con una yema axilar y un volumen de 30 mL de medio de cultivo líquido por segmento nodal. Las condiciones de cultivo empleadas fueron temperatura de $25 \pm 2,0$ °C e iluminación artificial mediante tubos fluorescentes de 40 W, con un régimen de fotoperiodo de 16 horas luz y una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (FFF) de $42,048,0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$

Multiplicación de segmentos nodales

Con el objetivo de evaluar el efecto de los sistemas de cultivo semiautomatizados en la multiplicación *in vitro* de los segmentos nodales, se desarrolló el presente experimento que tuvo los tratamientos siguientes:

Sistema de cultivo I: Sistemas de inmersión temporal

El sistema de inmersión temporal estuvo compuesto por dos frascos de cultivo de vidrio de 5000 mL de capacidad, uno para el crecimiento de los segmentos nodales y el otro como reservorio de medio de cultivo. Estos frascos de cultivo se conectaron entre sí por una manguera de silicona de seis milímetros de diámetro, mediante conectores de vidrio que atravesaron la tapa del frasco. En la parte interna se colocó una manguera, la cual descendió hasta el fondo en ambos recipientes. El medio de cultivo circuló de un frasco de cultivo a otro en dependencia de la apertura o cierre de dos electroválvulas de tres vías, las cuales estaban conectadas a un temporizador programable para determinar el tiempo y la frecuencia de la inmersión. A la entrada de los frascos de cultivo se colocaron filtros hidrofóbicos ($0,22 \mu\text{m}$, Midisart 2000, Sartorius Co.) para garantizar la esterilidad del aire. La presión del aire de 2,0 atm proveniente de un compresor, fue regulada por un manómetro. Se empleó un tiempo de inmersión de 10 min con una frecuencia cada 6 horas (4 inmersiones por día) según resultados previos no mostrados.

Sistema de cultivo II: Sistema de inmersión constante con aireación mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo (SIC)

El sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo consistió en un frasco de cultivo de vidrio de 5000 mL de capacidad, en el cual se colocaron los segmentos nodales y el medio de cultivo. El aire proveniente del compresor circuló por una manguera de silicona de seis milímetros de diámetro que atravesó el tapón de goma mediante conectores de vidrio, la cual descendió hasta el fondo del frasco de cultivo. A la entrada y salida del frasco de cultivo se colocaron filtros hidrofóbicos ($0,22 \mu\text{m}$, Midisart 2000, Sartorius Co.) para garantizar la esterilidad del aire proveniente del compresor que permitió un flujo de aire de $25 \text{ ml}/\text{min}^{-1}$.

Sistema de cultivo III: (Control) Sistema con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna

El sistema con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna consistió en un frasco de cultivo de vidrio de 5000 mL de capacidad, en el cual se colocaron los segmentos nodales y el medio de cultivo líquido estático. El frasco de cultivo fue cerrado con un tapón de goma, que tenía en el centro un orificio de 5,0 mm de diámetro relleno con algodón para el intercambio de gases con el exterior.

Este experimento tuvo cinco repeticiones por cada tratamiento. A las seis semanas de cultivo se seleccionaron al azar 10 plantas en cada una de las repeticiones por tratamiento y se evaluó: altura de la planta (cm), número de entrenudos por planta, la masa fresca (gMF) de las plantas y luego de que éstas fueron colocadas en una estufa a 70 °C durante 48 horas se definió la masa seca (gMS). Se calculó el coeficiente de multiplicación al dividir

el número final de segmentos nodales con una yema axilar entre el número inicial. En cada una de las repeticiones por tratamiento se evaluó, de las 50 plantas cultivadas, el número de plantas con síntomas de vitrificación, aquellas que presentaron apariencia acuosa y hojas traslúcidas.

El procesamiento estadístico de los datos experimentales se realizó mediante un análisis de varianza. Para la comparación múltiple de medias se aplicó la prueba de Dunnett's C cuando no se encontró homogeneidad de varianza, y cuando ocurrió lo contrario se aplicó la prueba paramétrica de Tukey, con un nivel de significación de $p < 0,05$.

Resultados

Las plantas cultivadas en el sistema de inmersión temporal mostraron los mejores resultados para la altura de la planta, número de entrenudos por planta, así como para la masa fresca y seca de las plantas, con diferencias significativas respecto al sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo y al sistema de cultivo con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna utilizado como control (tabla 1).

Las plantas cultivadas en el sistema de inmersión temporal se caracterizaron por el mayor crecimiento de los segmentos nodales, coloración verde y hojas más desarrolladas, mientras que las plantas cultivadas en sistema de cultivo líquido estático presentaron tallos y hojas traslúcidas con apariencia turgente.

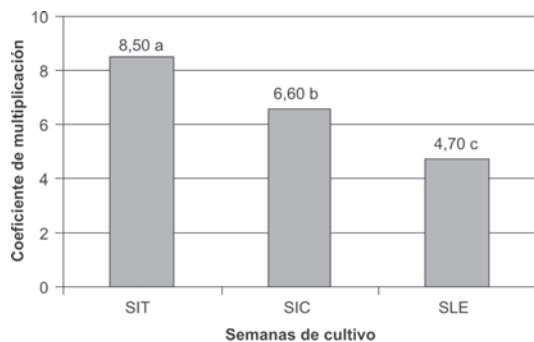
Con el empleo del sistema de inmersión temporal se obtuvieron los más altos valores para el coeficiente de multiplicación, con diferencias significativas respecto al sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo, y al sistema de cultivo con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna utilizado como control (figura 1).

Con el empleo del sistema de inmersión temporal también se obtuvo el menor número de plantas con síntomas de vitrificación, con diferencias significativas respecto a las plantas cultivadas en el sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo, y al sistema de cultivo con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna utilizado como control.

Tabla 1. Efecto del tipo de sistema de cultivo en la multiplicación de segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea a las seis semanas de cultivo.

Sistema de cultivo	Altura de la planta (cm)	Número de entrenudos por planta	Masa fresca de las plantas (gMF)	Masa seca de las plantas (gMS)
SIT	20,80±1,00 a	10,70±0,65 a	1,31±0,24 a	0,288±0,002 a
SIC	16,00±0,91 b	8,80±0,41 b	0,84±0,06 b	0,142±0,004 b
SLE	14,20±0,89 c	6,80±0,41 c	0,51±0,05 c	0,076±0,001 c
ES±	0,21*	0,11*	0,08*	0,001*

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Dunnett's C. Leyenda: ES: Error estándar

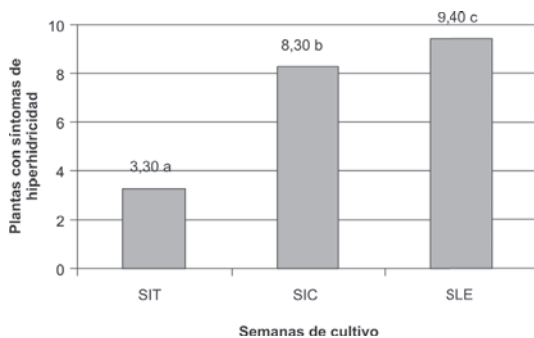


Medias con letras no comunes en una misma barra difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Tukey.

Leyenda

SIT: Sistema de Inmersión Temporal; SIC: Sistema de Inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo; SLE: Sistema de cultivo con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna.

Figura 1. Efecto del tipo de sistema de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación del clon de ñame “Blanco de Guinea” a las seis semanas de cultivo.



Medias con letras no comunes en una misma barra difieren estadísticamente para $p < 0,05$ según la prueba de Tukey.

Leyenda

SIT: Sistema de Inmersión Temporal; SIC: Sistema de Inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo; SLE: Sistema de cultivo con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna.

Figura 2. Efecto del tipo de sistema de cultivo sobre el número de plantas hiperhidratadas del clon de ñame ‘Blanco de Guinea’ a las seis semanas de cultivo.

Discusión

Los mejores resultados obtenidos para la multiplicación *in vitro* de los segmentos nodales de ñame con el sistema de inmersión temporal se deben a las condiciones físicas creadas en el interior del recipiente de cultivo (Escalona et ál., 2003). El contacto directo y renovado de los segmentos nodales con el medio de cultivo durante cada inmersión pudo haber provocado una asimilación más eficiente de elementos nutritivos. Con este tipo de sistema de cultivo se logró que los segmentos nodales estuvieran cubiertos por una fina película de medio de cultivo, lo cual impidió la desecación y además posibilitó una baja resistencia a la difusión de gases, por lo que debió haber existido una mínima interrupción de intercambio de gases entre los segmentos nodales y la atmósfera interna del recipiente de cultivo la cual, con el tiempo y la frecuencia de inmersión empleados, se pudo haber renovado completamente, favoreciendo un balance armónico de gases como oxígeno y dióxido de carbono, y limitando la acumulación de gases nocivos como el etileno en el interior del recipiente de cultivo, aspectos estos que según Berthouly y Etienne (2005) favorecen el crecimiento de los brotes en otras especies de plantas.

Las condiciones de cultivo creadas en el sistema de inmersión temporal provocaron cambios fisiológicos favorables para la multiplicación de los segmentos nodales, así como los más altos valores para la masa fresca y seca. Se debe señalar la importancia de los valores de masa seca como un indicadores de calidad de las plantas, pues ésta se compone principalmente de lignina y polisacáridos en la pared celular, además de componentes del protoplasma como proteínas, lípidos, aminoácidos, ácidos orgánicos y algunos elementos inorgánicos como el potasio (Aragón et ál., 2005).

El contacto intermitente de los explantes con el medio de cultivo tuvo gran importancia, tanto para la asimilación de los nutrientes por los explantes, como en la renovación de la atmósfera interna del recipiente de cultivo. El

tiempo de contacto de los explantes con el medio de cultivo ayudó a controlar la vitrificación causada por la carencia de oxígeno que apareció en un gran número de los segmentos nodales desarrollados en medios de cultivo líquidos estáticos con renovación pasiva de la atmósfera interna (McAlister et ál., 2005).

Pérez (2001) demostró para el crecimiento de los segmentos nodales en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), mediante el estudio de dos sistemas de cultivo semiautomatizados, el control semicontinuo del nivel de medio de cultivo y la inmersión temporal, que los segmentos nodales desarrolladas en el SIT presentaron coeficientes de multiplicación superior debido a las condiciones de cultivo creadas en este sistema de cultivo.

Los resultados logrados para el crecimiento de los segmentos nodales en el clon de ñame Blanco de Guinea en sistema de inmersión temporal se relacionan con los obtenidos por Escalona (2003) en la fase de elongación de brotes de piña (*Ananas comosus* L.). Estos brotes presentaron mayor masa seca y área foliar en comparación con los brotes cultivados en sistemas de cultivo convencional, debido a que las plantas en el sistema de inmersión presentaron una mayor absorción de azúcar y nitrógeno. Zobayed (2001) describió que la carencia de oxígeno en el interior de los frascos de cultivo en la micropropagación de la papa en sistemas de cultivo cerrado sin renovación de la atmósfera interna, y en sistema de cultivo con una ventilación difusa, provocó un lento crecimiento de los segmentos nodales, así como un pobre coeficiente de multiplicación.

Chakrabarty et ál. (2006) investigaron la dinámica de utilización de los nutrientes, así como varios parámetros de crecimiento y fisiológicos en la proliferación de brotes de manzana M9 EMLA cultivados en dos sistemas de biorreactores. Los brotes cultivados en el sistema de inmersión temporal presentaron mayor masa seca y calidad que los obtenidos en el sistema de inmersión constante, debido a que en este tipo de sistema de cultivo se crearon

mejores condiciones de cultivo para un metabolismo fotomixotrófico.

El empleo del medio de cultivo en estado líquido, para la multiplicación de los segmentos nodales de ñame en sistema de inmersión temporal, pudiera reducir los costos de producción de los propágulos de ñame, al no utilizar agente gelificante tradicionalmente usado en la gran mayoría de los protocolos descritos para la multiplicación de esta especie. Con este sistema de cultivo es posible disminuir la manipulación del material vegetal, reducir el número de frascos de cultivo, así como una menor utilización del espacio en las cámaras de crecimiento. Lorenzo et ál. (1998) calcularon que utilizando el sistema de inmersión temporal se redujo un 46% el costo de producción de la proliferación de los brotes de caña de azúcar (*Saccharum* sp.). Escalona et ál. (1999) desarrollaron un protocolo para propagar brotes de piña en SIT que redujo el costo de producción por planta en un 20% cuando se comparó con el método convencional que empleaba el medio de cultivo líquido.

Conclusiones

Los resultados obtenidos permitieron demostrar que es posible multiplicar los segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea en sistemas de cultivo semiautomatizado. Con el Sistema de inmersión temporal se incrementó el coeficiente de multiplicación de los segmentos nodales, lo que posibilitará incrementar el empleo de la micropropagación para la producción de semilla en el complejo *Dioscorea cayenensis* *D. rotundata*.

Referencias bibliográficas

- Balogun, M.O.; Fawole, I.; Ng SYC.; Ng Q.; Shiwachi, H.; Kikuno, H. (2006). Interaction among cultural factors in microtuberization of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Tropical Science* 46 (1), 55-59.
- Berthouly, M.; Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: HvoslefEide, A. K. y Preil, W. (eds.). *Liquid Culture Systems or in vitro Plant Propagation*. Springer. pp. 59-73.

- Castellanos, P. (ed.) (2004). Instructivo Técnico del Cultivo del Ñame. Ciudad de La Habana, Cuba: Minagri Sedgri/Agrinfor.
- Chakrabarty, D.; Dewir, YH.; Hahn, E. J.; Datta, S.; Paek, K. Y. (2006). The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock 'M9 EMLA' in temporary versus continuous immersion bioreactors. *Plant Growth Regul* 43, 184-189.
- Craufurd, PQ.; Battey, NH.; Ile, E.I.; Asedu, R. (2006). Phases of dormancy in yam tubers (*Dioscorea rotundata*). *Ann Bot* 97, 497-504.
- Escalona, M.; Lorenzo, J. C.; Gonzalez, B.; Dainta, M.; Fundora, Z.; Borroto, C. G. et ál. (1999). New system for *in vitro* propagation of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr). *Pineapple News* 5, 57.
- Escalona, M.; Samaon, G.; Borroto, C.; Desjardins, J. (2003). Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In vitro Cell. Dev Biol Plant* 39, 651-656.
- FAO. 2006. Los datos de Faostat. Disponible en: <http://www.fao.org>. [Fecha de consulta 7 de marzo de 2006].
- González, J. E. (2006). Diagnóstico de enfermedades virales pertenecientes al género de los Potivirus en los geneotipos de ñame 'Pacala Duclos' (*Dioscorea alata* L.) y ñame de Guinea (*Dioscorea rotundata* Poir). Aplicaciones de la corriente eléctrica. Tesis de Maestría. Universidad Central de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.
- Lebas BSM. (2002). Diversity of viruses infesting dioscorea species in the south pacific. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements of the University of Greenwich for the Degree of Doctor of Philosophy (Ph.D.). The University of Greenwich Natural Resources Institute.
- Lorenzo, J.C.; González, B. L.; Escalona, M.; Teisson, C.; Espinosa, P.; Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in a improved temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Org Cult* 54, 197-200.
- Malaurie, B.; Pungu, O.; Trouslot, M. (1995). Effect of growth regulators concentrations on morphological development of meristem tips in *Dioscorea cayenensis-D. Rotundata* complex and *D. praehensilis*. *Plant Cell Tiss Org Cult* 41, 229-235.
- McAlister, B.; Finnie, J.; Watt, M. P.; Blakeway, F. (2005). Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). *Plant Cell Tiss Org Cult* 81, 347-358.
- Murashige, T.; Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15, 473-497.
- Ondo, P.; Kevers, C.; Dommes, J. (2007). Axillary proliferation and tuberization of *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex. *Plant Cell Tiss Org Cult* 91, 107-109.
- Perea, M. (2001). Contribución de la biotecnología al desarrollo sostenible del cultivo del ñame. En: Perea, M. (ed.). *Biotecnología Agrícola*. Bogotá: Editora Guadalupe. pp. 289-301.
- Pérez, N. (2001). Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en Sistemas de Inmersión Temporal. Tesis de Maestría. Universidad Central de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Santa Clara, Cuba.
- Tschannen, A. B.; Escher, F.; Stamp, P. (2005). Post harvest treatment of seed tubers with gibberellic acid and field performance of yam (*Dioscorea cayenensis- rotundata*) in Ivory Coast. *Expl Agric* 41, 175-186.
- Zobayed, S. M. A.; Armstrong J.; Armstrong W. (2001). Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. *Annals of Botany* 87, 53-59.