

Microtuberización en Ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella"

Microtuberisation in Yam (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella"

Robinson Salazar Díaz* , Javier Darío Beltrán Herrera **.

RESUMEN

Segmentos nodales de Ñame (*Dioscorea alata* L.) variedad "Pico de Botella" fueron cultivados *in vitro* en medio de tuberización (MT) de acuerdo a Mantell y Hugo (1989) suplementado con 0.1 mg/L de Tiamina, 100 mg/L de Mioinositol, 20 mg/L de L-Cisteina, 1 g/L de Carbón Activado, 0.8% de Agar-Agar a un pH 5.8 para evaluar los efectos del fotoperiodo (8 y 16 horas), sacarosa (3,6 y 9 %), kinetina (0.0,1.5 y 2.5 μ M, ácido abscisico (0.0,1.0 y 2.0 μ M) sobre la producción de microtubérculos. Se realizó un diseño de parcelas subdivididas y organizadas completamente al azar, los datos se analizaron mediante un ANOVA; se encontró que todos los factores evaluados tienen un efecto substancial sobre la inducción, formación y desarrollo de los microtubérculos. En los tratamientos con kinetina el número más alto de microtubérculos fue obtenido bajo un fotoperiodo de 8 horas, 9% de sacarosa y 1.5 μ M de kinetina; mientras que los microtubérculos de mayor peso fueron obtenidos generalmente a un fotoperiodo de 8 horas, 9% de sacarosa y en ausencia de kinetina. Para los tratamientos con ácido abscisico el número y peso más alto se presentó bajo un fotoperiodo de 8 horas, 6% de sacarosa y 1.0 μ M de ácido abscisico. En estas condiciones los cultivos produjeron 235 microtubérculos con un tamaño entre 1.3 y 22.8 mm y un peso entre 2.3 y 217.4 mg. Los anteriores resultados confirman la posibilidad de producción de microtubérculos *in vitro*, con gran potencial para su evaluación como semilla comercial de ñame y como una herramienta adicional a la propagación clonal, permitiendo un mejor manejo y conservación de germoplasma de esta especie.

Palabras clave: Microtubérculos, Ácido abscisico, Kinetina, Sacarosa, Fotoperiodo.

ABSTRACT

Nodal "Pico de Botella" yam segments (*Dioscorea alata* L.) were cultured in tuberisation médium (TM) following Mantell and Hugo's technique (1989). This was supplemented with 0.1 mg/L thiamine, 100 mg/L myoinositol, 20 mg/L L-cystein, 1 g/L activated charcoal and 0.8% agar at pH 5.8 to evaluate the effects of the photoperiod (8 and 16 hours), sucrose (3, 6 and 9%), kinetin (0.0,1.5 and 2.5 μ M) and abscisic acid (0.0,1.0 and 2.0 μ M) on micro-tuber production. A randomised split-plot experiment was carried out. Data analysed by ANOVA revealed that those factors evaluated had a substantial effect on micro-tuber induction, formation and development. The highest number of micro-tubers was obtained in an 8-hour photoperiod when treated with 1.5 μ M kinetin and 9% sucrose, whilst heavier micro-tubers were generally obtained in an 8-hour photoperiod with 9% sucrose in the absence of kinetin. The highest number of micro-tubers and greatest weight were presented by treatment involving an 8-hour photoperiod, 6% sucrose and 1.0 μ M abscisic acid. Such treatment led to 235 micro-tubers being obtained, presenting 1.3 to 22.8 mm length and 2.3 to 217.4 mg weight. These results confirm the possibility of micro-tuber *in vitro* induction, representing great potential as commercial seed for yam growers and an additional tool for the cloned propagation of plants contributing to better handling and conservation of this cultivar's germplasm.

Key words: micro-tubers, abscisic acid, kinetin, sucrose, photoperiod.

* Biólogo con énfasis en Biotecnología. Carrera 23 # 23 - 69 2do piso. Sincelejo - Sucre. Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Universidad de Sucre. E-mail: tuber@angelfire.com

** Ph.D. Fitopatología.Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Universidad de Sucre. Sincelejo-Sucre. E-mail: daño.bel @ unisucre.edu.co

Recibido: julio 26 de 2002; aceptado: enero 31 de 2003

INTRODUCCIÓN

Los ñames son plantas monocotiledóneas de la familia de las Dioscoreaceas la cual consta de 10 géneros y alrededor de 600 especies distribuidas en las regiones cálidas y tropicales del mundo, Estas plantas son anuales, tienen brotes de enredaderas con hojas acorazonadas, bajo tierra desarrollan el tubérculo de color café el cual puede medir hasta 1 mt de largo y pesar 20 a 30 Kg (Uwe, 1988). El ñame es muy importante por la provisión de energía en forma de carbohidratos para millones de personas en muchos países tropicales (Mantell *et al.* 1998).

Uno de los problemas que afecta a los productores de la costa caribe colombiana es la poca disponibilidad de semilla resistente al ataque del hongo (*Colletotrichum gloeosporioides*) y virus (potyvirus, badnavirus, carlavirus, etc.), los cuales disminuyen la producción de este importante producto alimenticio (Osorio y Ramírez, 1989). Atendiendo a esta problemática y teniendo en cuenta el papel significativo que ha tenido el ñame en la agricultura regional, se han comenzado a establecer tecnologías de producción conducidas a la obtención y distribución de material libre de patógenos para proveerlas a los productores y así ampliar y complementar los programas de producción de ñame en el país.

Hay reportes sobre micropropagación de algunos ñames comestibles como *D. rotundata* cv "espino" (Acosta y Beltrán, 2001); *D. alata* cv "Pico de Botella" (Rodríguez y Beltrán, 2001); embriogénesis somática en *D. alata* cv "Diamante 22" (Espitia y Quintero, 1999) entre otros. Estos métodos han sido exitosos y en algunos casos están siendo implementados a gran escala. Sin embargo, hay algunos problemas al momento de establecer estos materiales en campo como transporte, tasa de supervivencia y personal entrenado, el cual es escaso en nuestra región. La tuberización *in vitro* ha sido reportada en diferentes especies de *Dioscorea*, entre los factores que influyen el proceso de tuberización se encuentran reguladores de crecimiento, concentración de sacarosa, suministro de nitrógeno, fotoperíodo, intensidad lumínica e inhibidores de crecimiento (Perea y Buitrago, 2000). Aún es poca la información sobre tuberización *in vitro* en especies de *Dioscorea* y sobre todo en muchas de sus variedades. En la Universidad de Sucre se están realizando estudios sobre la producción de microtubérculos *in vi-*

tro como una herramienta adicional a la propagación clonal de ñame lo cual permitiría un mejor manejo del material *in vitro* para la provisión de semilla libre de patógenos.

En este trabajo se evalúan los efectos de varios factores como fotoperíodo, concentración de sacarosa y reguladores de crecimiento sobre la inducción, formación y desarrollo de microtubérculos en ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella" una de las variedades más productivas y económicamente importante del departamento de Sucre y de la región caribe colombiana.

METODOLOGÍA

Obtención de un banco de germoplasma *in vitro*

Tubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "pico de botella" fueron suministrados por el banco de germoplasma de la Universidad de Córdoba (Montería - Córdoba) de los cuales se obtuvieron las plantas madres que fueron utilizadas para la multiplicación *in vitro* de este material.

Producción de microtubérculos a partir de segmentos nodales

En esta etapa se realizaron cuatro experimentos para evaluar los efectos del fotoperíodo (8 y 16 horas), concentración de sacarosa (30, 60 y 90 g/L), regulador de crecimiento: kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μM ; experimentos 1 y 3); ABA (0.0, 1.0 y 2.0 μM ; experimentos 2 y 4) y dos tipos de medio de cultivo: medio de tuberización (MT) (Mantell y Hugo, 1989) y sales básicas de Murashige y Skoog; sobre la inducción, formación y desarrollo de microtubérculos.

Datos sobre el número de explantes que tuberizaron, número promedio de microtubérculos por explante, peso promedio y biomasa total de microtubérculos fueron registrados después de 24 semanas de incubación a una humedad relativa de 50%, temperatura de 29 °C y una intensidad lumínica de 45 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$. Los microtubérculos cosechados fueron pesados, medidos (largo y diámetro) y almacenados en cajas de petri con papel absorbente humedecido.

Se utilizó un diseño de parcelas subdivididas organizadas en completamente al azar, los datos fueron analizados mediante un ANOVA y la prueba de rango múltiple de DUNCAN.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A las pocas semanas de incubación se observó en los cultivos que presentaron tuberización la formación de una masa indiferenciada de células (color blancuzco) en las axilas de las hojas y en algunos casos en la base del tallo; de esta masa se desprendían algunas raíces (figura 1a); pocas semanas más tarde se pudo observar la formación de una estructura similar a un microtubérculo joven (figura 1b y

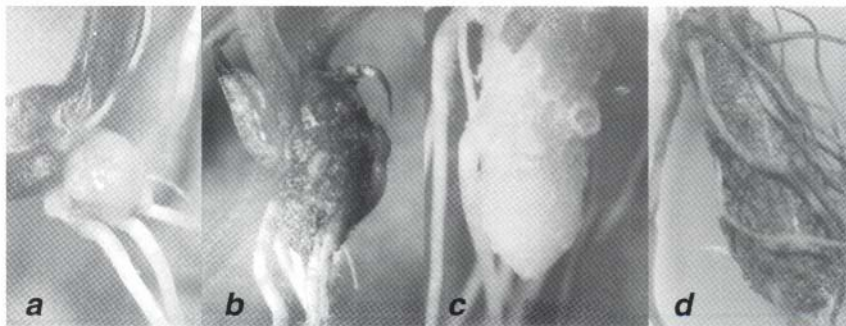


Figura 1. Estados de diferenciación y formación de microtubérculos encontrado en cultivo *in Vitro* de segmentos nodales de ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella". a) iniciación; b) formación de microtubérculo joven; c) alargamiento distal y d) microtubérculo maduro.



Figura 2. Vitroplanta de ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella". La flecha indica un microtubérculo maduro.

1c), el cual en el extremo distal a su unión con la vitroplanta, presentaba una zona de color blanco y de crecimiento continuo, más tarde se presentó un microtubérculo desarrollado (figura 1d). En la figura 2 se puede observar una vitroplanta de ñame (*Dioscorea alata* L.) var. "Pico de Botella" con un microtubérculo maduro.

Experimento 1

El fotoperíodo tuvo efecto significativo sobre el número de explantes que tuberizaron y sobre el número de microtubérculos por explante. El fotoperíodo y la sacarosa afectaron significativamente el peso promedio y la biomasa total de los microtubérculos producidos.

Teniendo en cuenta la interacción de los tres grupos de factores estudiados tenemos que hubo interacción significativa entre el fotoperíodo y la sacarosa (peso promedio y biomasa total de microtubérculos), fotoperíodo y sacarosa con Kinetina (número de microtubérculos por explante, peso promedio y biomasa total de microtubérculos). Un fotoperíodo de 8 horas generalmente promovió la mayor inducción, formación y desarrollo de microtubérculos con mayor peso fresco que un fotoperíodo de 16 horas.

La concentración de sacarosa que soportó el mayor número de explantes tuberizados fue 60 g/L aunque el mayor número de microtubérculos por explante, peso promedio y biomasa total fueron estimulados por una concentración de 90 g/L. A una concentración de 1.5 y 2.5 μ M de Kinetina se presentó el mayor porcentaje de tuberización y a 1.5 μ M el mayor número de microtubérculos por explante con respecto a las otras concentraciones utilizadas; la ausencia (0.0mM) y una concentración de 2.5 μ M de Kinetina en el medio de cultivo promovieron un peso promedio y una biomasa total de microtubérculos más alta que cuando se utilizó 1.5 μ M de Kinetina. Los resultados de este experimento son presentados en el cuadro 1. En la figura 3 se puede observar claramente una mejor respuesta a un fotoperíodo de 8 horas a medida que aumenta la concentración de sacarosa; presentándose un óptimo a 90 g/L. Además hay una marcada influencia por la presencia o ausencia de kinetina en el medio de cultivo.

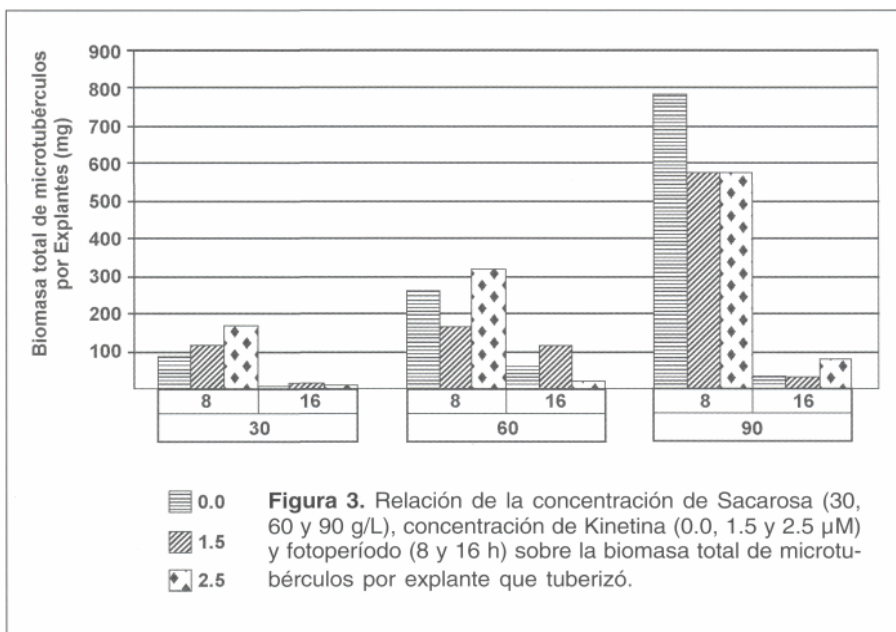


Figura 3. Relación de la concentración de Sacarosa (30, 60 y 90 g/L), concentración de Kinetina (0.0, 1.5 y 2.5 μM) y fotoperíodo (8 y 16 h) sobre la biomasa total de microtubérculos por explante que tuberizó.

concentraciones de ABA utilizadas; mientras que la ausencia en el medio de cultivo de ABA (0.0 μM) influyó en un mayor número promedio de microtubérculos por explante; los resultados son presentados en el cuadro 1. En la figura 4 se observa que la respuesta a un fotoperíodo de 8 horas se ve favorecida por una concentración de sacarosa de 60 g/L y disminuye a concentraciones de 30 ó 90 g/L. La interacción de estos niveles con 1.0 μM de ABA favorecen una mejor respuesta en cada uno de los parámetros evaluados.

Con relación al número promedio de microtubérculos

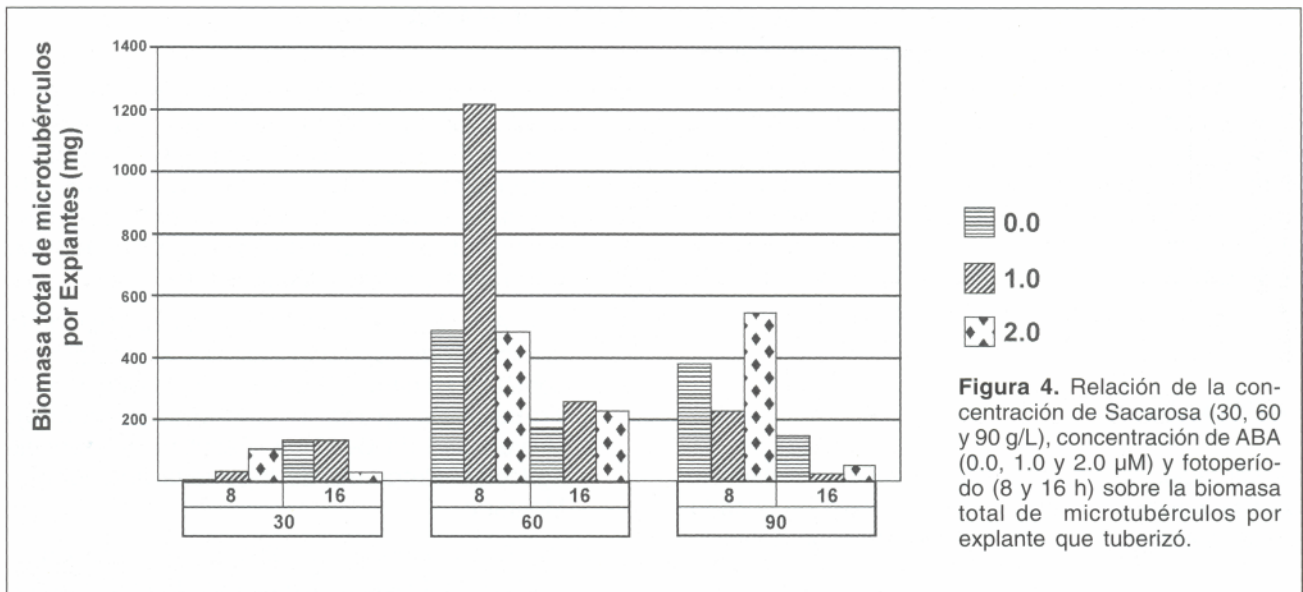
Experimento 2

Con relación a éste hubo efecto significativo del fotoperíodo sobre la biomasa total de microtubérculos y de la sacarosa sobre el número de microtubérculos por explante y biomasa total de microtubérculos. Teniendo en cuenta la interacción entre los grupos de factores estudiados se encontró que hubo interacción significativa entre el fotoperíodo y la sacarosa (número de explantes que tuberizaron, número de microtubérculos por explante y peso promedio de microtubérculos por explante), fotoperíodo y sacarosa con ABA (número de explantes que tuberizaron, número promedio de microtubérculos por explante, peso promedio y biomasa total de microtubérculos). Al igual que en el experimento 1, ambos fotoperíodos influyeron en la producción de microtubérculos y al igual que en este en el fotoperíodo de 8 horas se presentó el más alto porcentaje de explantes que tuberizaron, número de microtubérculos, peso promedio y biomasa total que en el fotoperíodo de 16 horas. La concentración de sacarosa en la cual se presentó el mayor número de explantes tuberizados, el mayor número de microtubérculos por explante, peso promedio y biomasa total de microtubérculos más alta fue a 60 g/L. A una concentración de 1.0 μM de ABA se presentó el porcentaje de tuberización, peso promedio y la biomasa total de microtubérculos más alta con relación a las otras

por explante; para el experimento 1 fueron 1.228 microtubérculos por explante y para el experimento 2 (1.355) microtubérculos por explante. Los pesos promedios de microtubérculos fueron: 415.368 y 547.57 mg para el experimento 1 y 2 respectivamente. La biomasa total de los microtubérculos producidos fue para el experimento 1: (3421.5 mg) y para el 2: (4653.3 mg). En el experimento 1 se obtuvieron 113 microtubérculos, los cuales presentaron un peso entre 2.3 y 169.6 mg. una longitud de 1.3 a 22.2 mm y un diámetro entre 1.5 y 5.5 mm. En el experimento 2 se obtuvieron 122 microtubérculos con un peso entre un rango de 5.0 y 217.4 mg, una longitud entre 2.8 y 22.8 mm y un diámetro de 1.5 a 10.2 mm.

Experimentos 3 y 4

En estos experimentos donde las sales utilizadas fueron las del medio basal Murashige y Skoog (MS); ninguno de los niveles de los factores utilizados influyó la inducción y formación de microtubérculos. En este caso los cultivos expresaron una alta sensibilidad a las condiciones de cultivo en el sentido que se presentó una alta formación de callo en la base del tallo; este fenómeno se pudo observar a ambos fotoperíodos y en las concentraciones de sacarosa utilizadas (Ng, 1988).



FACTOR	No. De explantes cultivados	% de explantes que tubercizaron	Número promedio de MT por explante	Peso promedio de MT por explante (mg)	Biomasa Total (mg)
EXPERIMENTO 1					
(a) Fotoperíodo: Horas					
8	90	67.77 a	1.3442 a	37.217 a	3051.8 a
16	90	34.44 b	1 b	11.9258 b	369.7 b
(b) Sacarosa: g/L					
30	60	41.666 a	1.04 a	15.5769 a	405 a
60	60	58.333 a	1.2285 a	21.8581 b	939.9 b
90	60	53.333 a	1.375 a	47.1954 c	2076.6 c
(c) Kinetina : μM					
0	60	48.333 a	1.2068 a	35.1114 a	1228.9 a
1.5	60	53.333 a	1.25 a	25.5375 a	1021.5 a
2.5	60	51.666 a	1.2258 a	30.8184 a	1171.1 a
EXPERIMENTO 2					
(a) Fotoperíodo: Horas					
8	90	53.333 a	1.4375 a	50.5608 a	3488.7 a
16	90	46.666 a	1.2619 a	21.9754 b	1164.7 b

Cuadro 1. Efectos principales del fotoperíodo, concentración de Sacarosa y regulador de crecimiento sobre el desarrollo de microtubérculos en cultivos de segmentos nodales de ñame *D. alata* L. var. "Pico de Botella".

El incremento en el número de microtubérculos y la biomasa total observada a 8 horas puede ser atribuida a la longitud del fotoperíodo, en este reporte el mayor número de microtubérculos presentados fueron aéreos tanto a un fotoperíodo de 8 como a 16 horas. Aunque se observó un alto número de microtubérculos en el fotoperíodo de 16 horas, este fotoperíodo no promovió el desarrollo de los microtubérculos, lo cual se ve reflejado en los pesos promedios y biomasa total bajos con respecto a los obtenidos a un fotoperíodo de 8 horas en ambos experimentos.

CONCLUSIONES

La utilización del medio de tuberización es esencial para la inducción, formación y desarrollo de microtubérculos en ñame (*D. alata* L.) var. "Pico de Botella".

La longitud del fotoperíodo tiene una fuerte influencia sobre el desarrollo de microtubérculos en (*D. alata* L.) var. "Pico de Botella" dándose un mejor desarrollo de los microtubérculos a un fotoperíodo de 8 horas.

En este estudio se reporta el efecto inhibitorio del medio MS sobre el proceso de tuberización en (*D. alata* L.) var. "Pico de Botella", lo cual puede ser debido a la presencia de altos niveles de nitrógeno en las formas de nitrato de amonio y nitrato de potasio en este medio (Mantell y Hugo, 1989; Jean y Cappadocia, 1991); además, este resultado puede estar sujeto al genotipo utilizado.

Los resultados presentados en este trabajo sugieren que cada uno de los factores evaluados no favorecen por sí solos la inducción, formación y desarrollo de microtubérculos; sino que, la regulación del desarrollo de estos órganos de almacenamiento implica la interacción entre ellos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sucre y al Programa de Biotecnología Agrícola (PBA), Proyecto Ñame. Ministerio de Cooperación del Gobierno de Holanda (DGIS) y Centro de Estudios Ganaderos y Agrícolas (CEGA).

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, R. y Beltrán, H. 2001. Estandarización de la técnica de micropropagación para la obtención masiva de plantas de ñame espino (*Dioscorea rotundata*) mediante el cultivo *In vitro* de segmentos nodales. Memorias XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. ACCB. Cartagena de Indias. Octubre 10-13.
- Espitia A. A. y Quintero I. 1999. Estandarización de la técnica de micropropagación por embriogenesis somática en ñame (*D. alata* L.) var. Diamante 22. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo). Universidad de Córdoba. Facultad de ciencias agrícolas. Programa de Ingeniería agronómica. Montería.
- Jean, M. & Cappadocia, M. 1991. *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. "Brazo Fuerte" and "Florido" and *D. abyssinica* Hoch. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Vol(26):147 - 152.
- Mantell, S. & Hugo, A. 1989. Effects of photoperiod, mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinina on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. *Plant Cell, Tissue and organ culture*. Vol(16): 23 - 37.9.
- Mantell, S. Hague, S. & Shandler, F. 1998. Cultivo de tejidos y material de propagación libre de enfermedades en el ñame. En: Curso taller aplicaciones de los sistemas *in vitro* en el cultivo de ñame (*Dioscorea alata* L.) Universidad Nacional. Bogotá. Mayo 11-22.
- Ng, S. 1988. *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Plant cell, tissue and organ culture*. Vol (14): 121 -128.
- Osorio, C. y Ramírez., N. 1989. Principales enfermedades del ñame en la región caribe colombiana. ICA- INFORMA. Vol (23): 13-19.
- Perea, M. y Buitrago, G. 2000. Aplicación de la biotecnología al cultivo de ñame. En: ÑAME: Producción de semillas por biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Rodríguez, C. y Beltrán, J. 2001. Cultivo *In vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) C.V. "Pico de Botella" a partir de segmentos nodales. Memorias XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. ACCB. Cartagena de Indias. Octubre 10-13.
- Uwe, S. 1988. Yam (ñame) - Una importante planta útil de África Occidental. En: *Correo fitosanitario*. Bayer. V(2):7-10