



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE VIANDAS TROPICALES

FORMACION DE MICROTUBERCULOS DE ÑAME (*Dioscorea alata* L.)
CLON 'PACALA DUCLOS' EN SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL
COMO MATERIAL VEGETAL DE PLANTACION

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas

Manuel Alfredo Cabrera Jova

Santa Clara
2009

UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE LAS PLANTAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE VIANDAS TROPICALES

FORMACION DE MICROTUBERCULOS DE ÑAME (*Dioscorea alata* L.)
CLON 'PACALA DUCLOS' EN SISTEMA DE INMERSION TEMPORAL
COMO MATERIAL VEGETAL DE PLANTACION

Tesis presentada en opción al grado científico de
Doctor en Ciencias Agrícolas

Autor: Ing. Manuel Alfredo Cabrera Jova, MSc

Tutor: Inv. Tit., Ing. Rafael Gómez Kosky, Dr. C

Consultante: Inv. Tit., Ing. Manuel de Feria Silva, Dr. C

Santa Clara
2009

SÍNTESIS

La formación de microtubérculos en algunas especies de plantas constituye una importante alternativa para la producción de material vegetal de plantación. El presente trabajo se realizó con el objetivo de formar microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' en sistemas de inmersión temporal que permitieran utilizarlos como material vegetal de plantación en campo. La tuberización *in vitro* se desarrolló en dos etapas de cultivo. Se definió el tipo de sistema de cultivo y se determinaron las condiciones de cultivo para la formación de microtubérculos, y además se evaluó en campo los microtubérculos que se emplearon como material vegetal de plantación. En la etapa de crecimiento de las plantas y en la de formación de microtubérculos se definió a través de la evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos emplear el sistema de inmersión temporal. Con 15 minutos de inmersión cada seis horas, un volumen de 60 mL de medio de cultivo por planta *in vitro* y cuatro renovaciones del medio de cultivo se formaron 355 microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g por sistema de inmersión temporal. De estos 317 presentaron una masa fresca superior a 1,0 g y 121 de ellos presentó una masa fresca igual o superior a 3,0 g. Fue posible plantar los microtubérculos directo en campo, aunque se determinó que aquellos con una masa fresca igual o superior a 3,0 gMF presentaron el mejor porcentaje de brotación (91,30%) y supervivencia de las plantas (96,50%). Estas mostraron las mejores respuestas en los caracteres cuantitativos que se evaluaron en campo. Las plantas procedentes de las secciones de tubérculos que se obtuvieron de las plantas de los microtubérculos mantuvieron su potencial *in vitro*, ellas produjeron el mayor número (3,80) y masa fresca de los tubérculos (4,12 kg) por planta. A partir de estos resultados se propuso un esquema para la formación de microtubérculos en sistema de inmersión temporal y su empleo como material vegetal de plantación directo a campo.

Abreviaturas	Descripción completa
CIRAD	Centro de Cooperación Internacional en Investigaciones Agronómicas para el Desarrollo
CRAS	Centro de Reproducción Acelerada de Semillas
EE	Error estándar
EUA	Estados Unidos de América
gMF	Gramos de masa fresca
gMS	Gramos de masa seca
MS	Medio de cultivo basal propuesto por Murashige y Skoog (1962)
RITA®	Recipiente de inmersión temporal automatizado
SIT	Sistema de inmersión temporal
SIC	Sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo
SLE	Sistema de inmersión constante en medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	5
2.1. El cultivo del ñame. Generalidades	5
2.1.1. Origen y distribución	5
2.1.2. Sistemática y botánica.....	5
2.1.3. Características del clon ‘Pacala Duclos’	6
2.2. Importancia económica del cultivo.....	6
2.3. Producción de material vegetal de plantación de ñame.....	8
2.4. Métodos de propagación <i>in vitro</i> empleados para la obtención de material vegetal de plantación de ñame	10
2.4.1. Establecimiento de plantas <i>in vitro</i>	10
2.4.2. Producción de tubérculos <i>in vitro</i>	12
2.5. Automatización de la micropropagación	15
2.5.1. Empleo de medios de cultivo líquidos. Ventajas y desventajas.....	15
2.5.2. Sistemas de Inmersión Temporal	17
2.5.3. Producción de microtubérculos en sistemas de cultivo automatizados	19
2.6. Empleo de los microtubérculos como material vegetal de plantación en campo.....	22
3. MATERIALES Y METODOS	25
3.1. Efecto del tipo de sistema de cultivo en medio líquido sobre la tuberización <i>in vitro</i> ... 31	
3.1.1. Evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos en la etapa de crecimiento de las plantas	35
3.1.2. Evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos en la etapa de formación de microtubérculos	36
3.1.3. Determinación de azúcares reductores y nutrientes minerales en el medio de cultivo del sistema de inmersión temporal	37
3.2. Efecto de las condiciones de cultivo en el sistema de inmersión temporal sobre la formación de microtubérculos.....	37
3.2.1. Efecto del tiempo de inmersión.....	37
3.2.2. Efecto de la frecuencia de inmersión	38
3.2.3. Efecto del volumen de medio de cultivo por planta cultivada <i>in vitro</i>	38

3.2.4. Efecto de las renovaciones del medio de cultivo.....	39
3.3. Evaluación de la respuesta morfoagronómica de las plantas obtenidas de los microtubérculos que se produjeron en SIT y de su primera multiplicación en campo	40
3.3.1. Influencia de la masa fresca de los microtubérculos sobre su brotación, y sobre la supervivencia y caracteres morfoagronómicos de las plantas derivadas de estos.....	40
3.3.2. Evaluación morfoagronómica de las plantas procedentes de la primera multiplicación vegetativa de los microtubérculos producidos en SIT	42
4. RESULTADOS Y DISCUSION	44
4.1. Efecto del tipo de sistema de cultivo en medio líquido sobre la tuberización <i>in vitro</i> ...	44
4.1.1. Evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos en la etapa de crecimiento de las plantas	44
4.1.2. Evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos en la etapa de formación de microtubérculos	49
4.1.3. Determinación de azúcares reductores y nutrientes minerales en el medio de cultivo del sistema de inmersión temporal	55
4.2. Efecto de las condiciones de cultivo en el sistema de inmersión temporal sobre la formación de microtubérculos.....	60
4.2.1. Efecto del tiempo de inmersión.....	60
4.2.2. Efecto de la frecuencia de inmersión	63
4.2.3. Efecto del volumen de medio de cultivo por planta cultivada <i>in vitro</i>	67
4.2.4. Efecto de las renovaciones del medio de cultivo.....	70
4.3. Evaluación de la respuesta morfoagronómica de las plantas obtenidas de los microtubérculos que se produjeron en SIT y de su primera multiplicación en campo	74
4.3.1. Influencia de la masa fresca de los microtubérculos sobre su brotación, y sobre la supervivencia y caracteres morfoagronómicos de las plantas derivadas de estos.....	74
4.3.2. Evaluación morfoagronómica de las plantas procedentes de la primera multiplicación vegetativa de los microtubérculos producidos en SIT	83
5. CONCLUSIONES	88
6. RECOMENDACIONES	89
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	
8. ANEXOS.....	

1. INTRODUCCION

El cultivo del ñame (*Dioscorea* spp.) ha contribuido a los requerimientos energéticos y nutricionales de una gran parte de las poblaciones en los países en desarrollo (Perea, 2001; Tamiru *et al.*, 2008). Por su amplia gama de usos y su eficiencia para producir energía digestible, se ha considerado junto al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), como uno de los tubérculos que más se producirán en los próximos años para la alimentación humana (Scott *et al.*, 2006).

Dentro de las más de 600 especies del género *Dioscorea*, *Dioscorea alata* L. es una de las más cultivadas en el mundo. La producción mundial en el año 2008 se estimó en alrededor de 56,4 millones de toneladas (FAOSTAT, 2009).

Desde que esta especie se comenzó a cultivar por el hombre se ha propagado por tubérculos enteros, secciones de tubérculos o bulbillos aéreos. El uso continuado de este tipo de material vegetal de plantación tiene el inconveniente de que al plantarse de un año para otro en campo, se puede infestar por microorganismos patógenos y perder calidad fisiológica y sanitaria (Amusa *et al.*, 2003; Ovono *et al.*, 2007).

En Cuba, su producción ha ayudado a la diversidad y estabilidad alimentaria. Tradicionalmente este cultivo ha constituido una fuente importante de ingresos y empleo en las regiones oriental y central del país (Rodríguez, 2006). No obstante, su desarrollo extensivo, ha estado limitado, entre otras causas, por la poca disponibilidad de material vegetal de plantación con calidad fisiológica y sanitaria (Rodríguez, 2004). Esto se debe, fundamentalmente, a que los tubérculos, que constituyen la parte útil de la planta para la alimentación, también tienen que ser utilizados como material vegetal de plantación.

Diferentes métodos biotecnológicos también han sido empleados para la propagación de ñame pero la producción de plantas *in vitro* y microtubérculos, tienen aún limitaciones para su uso como material vegetal de plantación (Balogun *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007).

En el país, se han desarrollado protocolos de propagación *in vitro* de ñame por organogénesis, a partir de segmentos nodales, en diferentes clones (Medero *et al.*, 1999; Borges *et al.*, 2004). Estos han presentado bajos coeficientes de multiplicación y supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización y en campo. Por ello, se requiere continuar buscando alternativas para la producción de material vegetal de plantación.

Según Balogun (2005) y Ovono *et al.* (2007) en el cultivo del ñame, la producción de microtubérculos tiene un gran potencial como alternativa para la propagación. Pueden ser utilizados en los programas de producción de material vegetal de plantación, mejoramiento genético y conservación de germoplasma, debido a que los microtubérculos se pueden producir sin tener en cuenta la época del año, y a diferencia de las plantas *in vitro*, pueden ser almacenados por un período más prolongado de tiempo, sin perder su potencial de brotación (Jasik y Mantell, 2000; Mbanaso *et al.*, 2007; Pathirana *et al.*, 2008).

En *Dioscorea alata* L., la tuberización *in vitro* se ha desarrollado principalmente en medios de cultivo en estado semisólido y se ha caracterizado por la formación de pequeños microtubérculos con una masa fresca promedio inferior a 0,5 g (García *et al.*, 2004; Vaillant *et al.*, 2005; Balogun, 2009). Microtubérculos con estas características han presentado limitaciones tanto para la producción de microtubérculos en la fase de aclimatización, como para su plantación directa en campo (Ijoyah *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Balogun, 2009).

Una de las alternativas para incrementar la masa fresca de los microtubérculos en el cultivo de la papa ha sido el empleo combinado de medios de cultivo en estado líquido y sistemas de cultivo semi-automatizados (Teisson y Alvard, 1999; Pérez *et al.*, 2001; Piao *et al.*, 2003; Jiménez, 2005). Dentro de estos se han destacado los sistemas de inmersión temporal (SIT) basados en el contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes y en la renovación periódica de la atmósfera del frasco de cultivo (Escalona, 2006).




El clon 'Pacala Duclos' tiene interés para el país, debido a los hábitos de consumo y alto potencial productivo (Rodríguez, 2004). En este clon Cabrera *et al.* (2008), desarrollaron la tuberización *in vitro* en medio de cultivo en estado líquido estático y solo lograron producir microtubérculos con una masa fresca promedio de 0,3 g, a partir de los cuales no se obtuvieron resultados satisfactorios en cuanto a la brotación y supervivencia en campo.

La baja masa fresca de los microtubérculos ha constituido la problemática fundamental que ha limitado su uso como material vegetal de plantación directa en campo. Es por ello, que ha sido necesario continuar trabajando en la búsqueda de alternativas para incrementar la calidad de los microtubérculos de ñame en el clon 'Pacala Duclos' para que puedan ser empleados para este fin.

Por tal motivo, se planteó la hipótesis de trabajo siguiente:

Mediante la formación de microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' en sistema de inmersión temporal y variando las condiciones de cultivo en el mimos será posible incrementar el número y la masa fresca de estos lo cual posibilitará emplearlos como material vegetal para la plantación directa en campo.

Para validar esta hipótesis de trabajo, se propusieron los objetivos siguientes:

-  Evaluar la influencia de tres sistemas de cultivo en medio líquido sobre la tuberización *in vitro*.
-  Incrementar el número y la masa fresca de los microtubérculos mediante la variación de las condiciones de cultivo en el sistema de inmersión temporal.
-  Evaluar en campo la respuesta morfoagronómica de las plantas obtenidas de los microtubérculos y la primera multiplicación.

Novedad científica: Se logró por primera vez a nivel nacional e internacional desarrollar un esquema para la formación de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) clon 'Pacala Duclos' en sistema de inmersión temporal. Se describió la respuesta de diferentes variables fisiológicas como contenido de pigmentos fotosintéticos, actividad fotosintética, conductancia estomática, transpiración y contenido de almidón en las hojas y los microtubérculos, y además, se cuantificó la concentración de azúcares reductores y el contenido de los nutrientes del medio de cultivo en ambas etapas de la tuberización *in vitro*, aspectos estos nunca antes descrito en la literatura científica para este cultivo. Por primera vez se describen resultados relacionados con la plantación directa en campo y la respuesta morfoagronómica de plantas obtenidas de microtubérculos formados en el sistema de inmersión temporal y de plantas en una primera multiplicación.

Valor práctico: El esquema desarrollado para la formación de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) del clon 'Pacala Duclos' con el empleo del sistema de inmersión temporal constituye una valiosa alternativa que puede ser incorporada en el programa nacional de producción de material vegetal de plantación para este clon. Se logró con este sistema de cultivo incrementar la calidad de los microtubérculos lo cual permitió su plantación directa en campo.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. El cultivo del ñame. Generalidades

2.1.1. Origen y distribución

El género *Dioscorea* comprende varias especies originarias de diferentes áreas geográficas. *Dioscorea alata* L. es nativa del sudeste Asiático, de donde se extendió a Indonesia, África y América Tropical. En los trópicos ocupa las mayores áreas cultivadas y constituye una excelente fuente de carbohidratos (Janssens, 2001; Tamiru *et al.*, 2008).

En Cuba está representada por 87 clones en el banco de germoplasma que conserva el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) en condiciones de campo e *in vitro*. De ellos, un gran número ha sido cultivado tradicionalmente en las regiones oriental y central del país, aunque también algunos clones se plantan y consumen en otras áreas del territorio nacional (Milián *et al.*, 2005).

2.1.2. Sistemática y botánica

El ñame (*Dioscorea*) es un cultivo tropical y subtropical. Pertenecen a este género más de 600 especies de plantas monocotiledóneas anuales, dioicas, de flores pequeñas rosadas o crema (Perea, 2001). Su ubicación taxonómica, según Janssens (2001) es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Dioscoreales*

Familia: *Dioscoreaceae*

Género: *Dioscorea*

Especie: *Dioscorea alata* L.

Dioscorea alata L. es poliploide en grado avanzado y presenta un número de cromosomas $2n = (3x \text{ a } 8x)$.

Esta especie se caracteriza por presentar tallos alados de color verde o morados, sin espinas, la torsión es en sentido contrario al movimiento de las manecillas del reloj y pueden alcanzar una longitud de dos a seis metros. Las flores en las plantas masculinas pueden encontrarse en forma de panícula, mientras que en las plantas femeninas están en solitario en forma de espigas. Obtener semillas fértiles en esta especie es muy difícil. Los tubérculos pueden ser simples o compuestos y pueden llegar a pesar hasta 20 kg (Rodríguez, 2000; Scarcelli *et al.*, 2006).

2.1.3. Características del clon 'Pacala Duclos'

El clon de ñame 'Pacala Duclos' (*Dioscorea alata* L.) fue introducido en Cuba desde las Islas Guadalupe. Por su adaptabilidad a las condiciones climáticas del país, su alto potencial productivo (superior a las 20 t.ha⁻¹) y la aceptación por la población, se encuentra distribuido en las principales regiones productoras y constituye un clon comercial (MINAG, 2008).

Se caracteriza por poseer hojas acorazonadas, acuminadas, enteras, paralelinervias y opuestas. Las hojas jóvenes son de color morado y las adultas de color verde. Presenta pecíolos con cinco aristas y tallos también aristados, los cuales se enrollan en sentido contrario de las manecillas del reloj, sin espinas y de color verde con tintes morados. Los tubérculos son alargados-achatados, de color castaño oscuro, piel rugosa, subepidermis de color blanca y carne de color crema. Produce bulbillos aéreos. Este clon es tolerante a la enfermedad conocida como 'Antracnosis' causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, por lo que puede ser cultivado de forma rastrera (Milián *et al.*, 2005).

2.2. Importancia económica del cultivo

Los incrementos en la producción de raíces y tubérculos para el año 2020 se originarán por la demanda de papa (*Solanum tuberosum* L.) y ñame para alimento humano, así como, de yuca y boniato para alimento animal y producción de almidón (Scott *et al.*, 2006).

La producción mundial de ñame en los últimos cinco años se estima en más 253,5 millones de toneladas y se siembran más de 5,5 millones de hectáreas anualmente (FAOSTAT, 2009). Debido a que este cultivo tiene una amplia gama de usos: alimentos básicos (consumo fresco y en forma procesada), alimento animal y como materia prima para fines industriales, éste cultivo se ha convertido en una fuente cada vez más importante de alimento, empleo rural y de ingreso para la creciente población de los países en desarrollo (Tamiru *et al.*, 2008).

El ñame proporciona alrededor de 200 calorías en la dieta diaria de más de 300 millones de personas del trópico (Balogun, 2009). Tiene una composición similar a la papa, pero con un mayor contenido de proteínas, por esa razón es más apreciado en muchos países. Es un alimento saludable, nutricional y con bajos contenidos de grasa que suple muchos de los nutrientes importantes de la dieta. Sus tubérculos son una excelente fuente de carbohidratos; contienen vitaminas como tiamina, riboflavina, niacina, ácido ascórbico y carotenos. Además, poseen la mayor parte de los aminoácidos esenciales: arginina, leucina, isoleucina y valina; en menor cantidad se encuentran histidina, metionina y triptófano. También el ñame es rico en minerales como el calcio, el hierro y el fósforo (Perea, 2001; Lowell *et al.*, 2007).

En Cuba, el ñame se ha convertido en un excelente cultivo de ecosistemas montañosos, a partir del cual los campesinos satisfacen parte de sus requerimientos energéticos y lo utilizan como alimento animal. La demanda en el mercado nacional se ha incrementado en los últimos años, no sólo en las regiones que tradicionalmente han plantado ñame, sino también en el occidente del país, debido a la constante migración de personas de una región a otra. Igualmente, ha existido una fuerte demanda para la exportación hacia Islas del Caribe, Norte América y Europa, que no pueden ser satisfechas por las bajas producciones actuales de este cultivo, debido entre otras causas a la falta de material vegetal de

plantación de calidad, para incrementar los volúmenes de plantación y producción (Rodríguez, 2004).

2.3. Producción de material vegetal de plantación de ñame

El desarrollo extensivo del cultivo del ñame en el sector estatal y por los campesinos encargados de la producción de raíces y tubérculos en el país, está limitado por la poca disponibilidad de material vegetal de plantación de calidad. De los tubérculos cosechados, un tercio debe ser conservado por los agricultores para ser empleado como semilla. En ocasiones, este alto volumen de tubérculos incluye aquellos sin valor comercial y de baja calidad, lo cual puede comprometer las futuras producciones (Rodríguez, 2004).

El cultivo del ñame es afectado por varias enfermedades, tanto durante su desarrollo vegetativo en condiciones de campo, como en la post-cosecha, las cuales limitan la producción de material vegetal de plantación de calidad (Amusa *et al.*, 2003).

La antracnosis es considerada como la enfermedad fúngica más ampliamente distribuida y de mayor impacto en los países productores (Ruíz, 2003; Rodríguez, 2004). Además, dentro de las enfermedades virales, los miembros del grupo de los potivirus causan las mayores afectaciones al cultivo, donde se destaca el *Virus del Mosaico del Ñame* (VMÑ) como causante de las pérdidas más severas (González, 2006). Durante el almacenamiento en post-cosecha, los tubérculos pueden llegar a perder más del 50% de la materia fresca, debido a las pudriciones. Éstas son provocadas por el ataque de diferentes microorganismos patógenos, entre ellos, *Penicillium oxalicum* Link, *P. cyclopium* Link, *Aspergillus niger* P.E.L. van Tieghem y *Fusarium* spp. que penetran a través de heridas en los tubérculos, causadas por insectos como *Planococcus citri* Millière, *Aspidiella hartii* Boulenger y otros, así como por nemátodos, dentro los cuales se encuentra *Scutellonema bradys* y *Pratylenchus coffeae*. Estas pérdidas pueden ser también provocadas por inadecuada manipulación durante y después de la cosecha. Las enfermedades que afectan al cultivo, no sólo causan pérdidas

en los rendimientos, sino que reducen su calidad para el mercado y limitan la disponibilidad de material vegetal de plantación de calidad (Amusa *et al.*, 2003).

El ñame se propaga convencionalmente a través de tubérculos enteros, secciones de tubérculos con una masa fresca que oscile entre 50 a 150 g o bulbillos aéreos (MINAG, 2008). Su principal limitante es el bajo índice de multiplicación (1:10) comparado con los cereales (1:300). El material vegetal de plantación en ocasiones constituye el 50% del costo de producción total del cultivo (Balogun, 2009). Para dar solución a esta problemática se han estudiado varios métodos.

Wilson (1989) propuso el método de minifracciones que consistía en fraccionar los tubérculos en secciones de 25 g. Presenta como desventaja la poca homogeneidad en la brotación de éstos.

Otra vía de propagación utilizada ha sido la multiplicación de secciones del tallo con dos yemas, en los Centros de Reproducción Acelerada de Semillas (CRAS), la cual se caracterizó por una limitada supervivencia y enraizamiento de dichas secciones de tallos (Filipia y Algora, 1996).

Las técnicas de propagación convencional en este cultivo no garantizan producir volúmenes de material vegetal de plantación con calidad fisiológica, sanitaria y genética en cortos períodos de tiempo. Por este motivo, en algunos de los principales países productores, ha sido necesario recurrir al uso de los métodos biotecnológicos, a través de la producción de plantas *in vitro* y microtubérculos (Perea, 2001; Balogun, 2005; Tamiru *et al.*, 2008).

El Programa Nacional de Producción de Semillas propuesto por el INIVIT, prevé aumentar paulatinamente en los próximos años la producción *in vitro* y reproducir, bajo el sistema oficial de certificación de semillas con cuatro categorías, hasta llegar a satisfacer las necesidades de material vegetal de plantación con calidad (Rodríguez, 2004).

2.4. Métodos de propagación *in vitro* empleados para la obtención de material vegetal de plantación de ñame

La micropropagación fue definida como cualquier procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en plantas, órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plantas y permitan el desvío tanto del proceso sexual normal, como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Krikorian, 1991).

2.4.1. Establecimiento de plantas *in vitro*

La producción de plantas *in vitro* en este cultivo ha alcanzado auge en los principales países productores (Nigeria, Costa de Marfil y República Democrática del Congo) y es empleado en sus programas nacionales de semillas para la producción inicial del material vegetal de partida (Perea, 2001; Acha *et al.*, 2004).

Además, el cultivo de meristemas ha sido utilizado para la limpieza y saneamiento del material vegetal inicial que se quiere propagar (Maurie *et al.*, 1995). La micropropagación en el cultivo del ñame, ha estado dirigida a nivel mundial, básicamente, a solucionar problemas de enfermedades virales (Lebas, 2002; González, 2006).

Sin embargo, la propagación *in vitro* más generalizada, es a partir de segmentos nodales, procedentes de plantas certificadas como libres de enfermedades virales (Medero *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2007). Esta fue descrita por Mitchel *et al.* (1995) como la técnica que se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas o primordios de las hojas, los cuales son divididos y subcultivados repetidamente.

Ha sido demostrado para muchas especies que la micropropagación vía organogénesis, mediante el cultivo de yemas axilares, es el método más empleado en la propagación comercial y el más confiable para lograr una multiplicación repetible, sin alteraciones genéticas y libre de microorganismos contaminantes de carácter patógeno o endofítico (Pérez, 2001; Kikuno *et al.*, 2002). Su principal desventaja radica en la laboriosidad del

proceso, lo cual implica altos costos por mano de obra, bajos coeficientes de multiplicación en comparación con otros sistemas de regeneración y la escasa posibilidad de automatizar el proceso productivo (Kozai y Kubota, 2005; Kim *et al.*, 2005).

Ziv (2005) planteó que la micropropagación es una industria joven con un excelente futuro, pero según Read (2007) su incremento dependerá del desarrollo de nuevos sistemas de regeneración de plantas y técnicas para la automatización de los procesos, así como del mejoramiento de los sistemas de aclimatización de las plantas.

En la micropropagación del cultivo del ñame, la fase 0, comprende la selección de las plantas madre de acuerdo con sus características fenotípicas y de sanidad del clon a propagar. Los tubérculos seleccionados se trasladan a un aislador (casa de vidrio) donde existen condiciones semicontroladas de iluminación y riego, y se plantan en bolsas de polietileno que contengan compost como sustrato. En esta fase de cultivo se realiza un diagnóstico de los principales patógenos virales y solo se emplean en la fase de establecimiento los segmentos nodales procedentes de las plantas certificadas como libres de éstos.

En la fase de iniciación (I) se realiza el establecimiento *in vitro* de segmentos nodales. Tradicionalmente se ha empleado como medio de cultivo basal el compuesto por las sales inorgánicas y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS). A este se le adicionan citoquininas. Dentro de las más empleadas se encuentran Kinetina y 6-Bencilaminopurina (6-BAP), cuya concentración puede variar desde 0,05 hasta 2,0 mg. L⁻¹. El objetivo de esta fase de cultivo es lograr el establecimiento del material vegetal libre de contaminación microbiana y fisiológicamente vigoroso con el cual poder iniciar la posterior multiplicación.

La fase de multiplicación (Fase II) comprende la multiplicación de las plantas *in vitro* a través de segmentos nodales, en medio de cultivo MS. Se han desarrollado varios protocolos en los

cuales varía el estado físico del medio de cultivo. Por ejemplo, Mitchell *et al.* (1995), lo han empleado en estado semisólido y Malaurie *et al.* (1995), en el líquido estático. El crecimiento de los explantes ocurre bajo condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz y $25\pm 2,0$ °C (Medero *et al.*, 1999; Borges *et al.*, 2004). En esta fase de cultivo se utiliza una concentración de sacarosa de 30 g.L^{-1} y se pueden emplear o no, reguladores de crecimiento. Los más utilizados son el ácido giberélico (AG_3), ácido naftalenacético (ANA), 6-bencilaminopurina (6-BAP), kinetina (Kin), ancimidol (ANC) y paclobutrazol (PBZ) (García *et al.*, 2004).

Para el enraizamiento (Fase III), el manejo de los explantes es similar a la fase de multiplicación. Medero *et al.* (1999), recomienda incrementar la intensidad luminosa con el objetivo de estimular el fortalecimiento de las plantas *in vitro*, que posteriormente serán trasplantadas al ambiente exterior.

La micropropagación concluye con la fase de aclimatización (IV). En esta las plantas se colocan en contenedores con compost como sustrato y son cultivadas en condiciones semicontroladas de iluminación (70% de la radiación solar) y riego (cuatro veces al día para mantener una humedad relativa superior al 85%), hasta que puedan ser plantadas en campo (Saborio *et al.*, 2002).

Balogun *et al.* (2004) y Chen *et al.* (2007) comprobaron que las plantas *in vitro* de ñame, al ser colocadas en un medio de cultivo con altas concentraciones de sacarosa y cultivarse bajo un fotoperíodo favorable a la tuberización, según la especie y el genotipo en cuestión, producen microtubérculos, los cuales según investigaciones, son considerados propágulos ideales para la producción de material vegetal de plantación de alta calidad.

2.4.2. Producción de tubérculos *in vitro*

La producción de tubérculos *in vitro*, es una alternativa novedosa para la producción de material vegetal de plantación. (Ng y Ng, 1997; Jasik y Mantell, 2000; Balogun *et al.*, 2006).

Según Salazar y Beltrán (2003) los microtubérculos ofrecen ventajas en comparación con otros tipos de material vegetal de plantación. Estos pueden ser producidos en cualquier época del año y pueden ser almacenados en pequeños espacios durante un período determinado de tiempo sin perder su potencial de brotación. Además, pueden ser utilizados como materiales vegetales de partida en programas de producción de material de plantación para el desarrollo del cultivo en países que carecen de infraestructura adecuada y de experiencia en cultivo de tejidos.

Con el empleo de microtubérculos como material vegetal de plantación es posible lograr un escalonamiento de la producción, pues pueden ser utilizados en plantaciones tempranas en campo. Borges *et al.* (2004) y Balogun (2005) consideraron que los microtubérculos se han convertido en el material vegetal de mayores perspectivas para el intercambio internacional de germoplasma. Por su parte, Paulo y Ribeiro (2002) y Balogun (2009) les atribuyeron mayor fortaleza que a las plantas *in vitro*, pues los primeros han permitido mayor facilidad de manejo, almacenamiento y factibilidad para la plantación mecanizada.

La tuberización *in vitro* o microtuberización en el cultivo del ñame es un proceso de desarrollo muy complejo, influenciado por factores genéticos, fisiológicos y ambientales (Jasik y Mantell, 2000; Balogun, 2009).

La primera referencia en la literatura científica sobre la tuberización *in vitro* en *Dioscorea* fue publicada por Forsyth y Van Staden (1984), quienes usaron brotes etiolados para inducir la tuberización en un medio de cultivo con 80 g.L⁻¹ de sacarosa. Desde entonces, la utilización de reguladores del crecimiento para propiciar la tuberización *in vitro* ha sido objeto de varias investigaciones (Jean y Cappadocia, 1992; Ng y Ng, 1997).

Para inducir la tuberización *in vitro* en ñame se han utilizado varios medios de cultivo, en su mayoría basados en modificaciones realizadas a partir del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962). Sin embargo, en todos ha sido un requisito fundamental el

incremento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo de entre 60 y 120 g.L⁻¹. Se plantea en muchos casos que la sacarosa es el factor inductor más importante que influye en este suceso (Yu *et al.*, 2000; Balogun, 2005).

En numerosos trabajos sobre ñame se ha tratado de alterar el balance interno de los reguladores de crecimiento en la planta para favorecer la tuberización, modificando las concentraciones de estos en el medio de cultivo. Se ha trabajado principalmente con 6-BAP, Kin y Zeatina (Mantell y Hugo, 1989; Jean y Cappadocia, 1992); brasinoesteroides (Labrada *et al.*, 1997); ácido jasmónico (Bazabakana *et al.*, 2003) y retardadores del crecimiento como ancimidol y paclobutrazol (García *et al.*, 2004).

Con la finalidad de favorecer el proceso de tuberización *in vitro*, también ha sido utilizado el medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento (Ng, 1992; Balogun *et al.*, 2004), así como el fotoperíodo (Salazar y Beltran, 2003). El manejo de todos estos factores han dado por resultado la formación de microtubérculos en ñame, los cuales varían en cuanto al número por planta, así como en la masa fresca.

Bazabakana *et al.* (2003) describieron las modificaciones morfológicas en los segmentos nodales de ñame durante la tuberización y las dividieron en cuatro fases de cultivo principales:

- La fase de cultivo I, correspondió a la presencia de al menos de una yema axilar en el segmento nodal.
- La fase de cultivo II, se desarrolló durante las dos primeras semanas de cultivo. Esta se caracteriza por la elongación de la yema axilar, precedida por un engrosamiento y alargamiento en su base, resultando la formación de una protuberancia axilar. Histológicamente, esta protuberancia resultó de la actividad de cambium extrafascicular que es el responsable del crecimiento del tubérculo. Esta fase de

cultivo está referida como la primera evidencia morfológica de la formación de un microtubérculo.

- La fase de cultivo III, se caracteriza por el desarrollo de la protuberancia axilar, de la cual se forma una estructura de forma esférica similar a un microtubérculo joven. De esa protuberancia emergen raíces.
- En la Fase de cultivo IV, ocurre el engrosamiento, desarrollo y elongación de los jóvenes microtubérculos formados, y comienza la formación de una epidermis parda multiestratificada.

Aunque se han desarrollado protocolos para la producción de microtubérculos de ñame, aún no se ha podido implementar la utilización de estos como alternativa para la conservación e intercambio internacional de germoplasma, así como para la propagación masiva, debido a la baja eficiencia en cuanto al número de microtubérculos formados por planta y a la baja masa fresca (Balogun, 2009). Takayama y Akita (2005) han considerado que los sistemas de cultivo semi-automatizados pueden ayudar a resolver estas limitantes.

2.5. Automatización de la micropropagación

2.5.1. Empleo de medios de cultivo líquidos. Ventajas y desventajas

Para la micropropagación del ñame se han empleado los medios de cultivo en estado semisólido y líquido (Medero *et al.*, 1999). Este último, presenta varias ventajas, como: facilidad de preparación, esterilización y manipulación, mayor rapidez en la absorción de sustancias nutritivas y en la difusión de sustancias tóxicas producidas por el metabolismo de las plantas. El empleo del medio de cultivo en estado líquido aumenta la productividad de los operarios de cabinas de flujo laminar, debido a que los explantes sólo deben ser colocados en contacto con el medio de cultivo sin necesidad de manipularlos de forma individual. Los medios de cultivo líquidos brindan grandes posibilidades para la automatización y pueden reducir los costos de producción (Preil, 2005). Sin embargo, el medio de cultivo líquido en

condiciones estáticas en el cultivo *in vitro* provoca un efecto depresivo sobre el crecimiento de los tejidos, ya sea por hipoxia o por hiperhidricidad (Ziv, 2005; Preil, 2005).

La hipoxia es causada por una baja disponibilidad de oxígeno, necesario para el desarrollo de los tejidos (Jackson, 2005). La hiperhidricidad es el término empleado para caracterizar las malformaciones hiperhídricas que afectan tanto a las plantas herbáceas como a las leñosas durante su propagación vegetativa *in vitro*. Es descrita como un desorden fisiológico severo causado por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos. Las hojas y los tallos de las plantas hiperhídricas muestran una apariencia turgente y superficie acuosa, sus órganos se muestran translúcidos, menos verdes y se quiebran con facilidad (Ziv, 2005). Todo esto afecta el crecimiento de los explantes y han sido observados en varias especies de plantas (Berthouly y Etienne, 2005).

Para evitar este problema, se han desarrollado diferentes propuestas, dentro de las cuales se encuentran sistemas de control para alterar factores físicos – ambientales cerca del tejido, para la producción de menor número de plantas anormales, así como el aumento de la aeración mediante agitación o burbujeo en el medio de cultivo líquido. También, se han creado nuevos tipos de biorreactores y sistemas semi-automatizados de cultivo líquido, basados en la inmersión parcial y temporal de los explantes (Takayama y Akita 2005; Ziv, 2005; Berthouly y Etienne, 2005).

El empleo de los biorreactores fue señalado por primera vez por Takayama y Mizawa (1981) en la producción masiva de brotes de *Begonia* (*Begonia hiemalis* L.) Desde entonces, se han empleado para la producción de brotes, bulbos, microtubérculos y cormos de varias especies (Curtis, 2005).

Uno de los problemas a resolver en la propagación masiva es el alto costo de producción de plantas mediante el cultivo de tejidos (Ziv *et al.*, 2005). Ha sido señalado por Savangikar *et al.* (2005) que el empleo de la automatización reduce los costos, al disminuir el trabajo

manual e incrementar los ritmos de producción. Estos autores, también han señalado que es posible, en estos tipos de sistemas de cultivo, producir plantas y microtubérculos con una mejor respuesta en la fase de aclimatización y en campo.

2.5.2. Sistemas de Inmersión Temporal

Desde el empleo por primera vez, de los biorreactores se ha trabajado en la búsqueda de otros sistemas de cultivo semi-automatizados más baratos y eficientes para el cultivo de materiales vegetales (Mehrotra *et al.*, 2007).

Los sistemas de cultivo de inmersión temporal, basados en la adición y remoción del medio de cultivo líquido, evitan los problemas de asfixia e hiperhidricidad, los daños mecánicos y utilizan equipamiento menos complejos (Escalona *et al.*, 2003; Jiménez, 2005). Con este tipo de sistema de cultivo también es posible lograr un aumento en la eficiencia de la micropropagación, dado por el incremento de los ritmos de producción y la calidad de los propágulos (Berthouly y Etienne, 2005). El sistema de inmersión temporal provee a todos los explantes de un contacto con el medio de cultivo durante un período de tiempo muy corto, con una determinada frecuencia diaria. Además, estos tipos de sistemas de cultivo en comparación con los biorreactores son de fácil manejo y uso (Escalona, 2006).

A partir del principio de la inmersión temporal, han sido desarrollados numerosos sistemas de cultivo (Berthouly y Etienne, 2005). En el laboratorio Biotrop del CIRAD en Montpellier, Francia, fueron diseñados los recipientes de inmersión temporal denominados comercialmente RITA® (Teisson *et al.*, 1996), los que se han utilizado con éxito en la regeneración vía organogénesis y embriogénesis somática de numerosas especies de plantas (Berthouly y Etienne, 2005). En ellos ha sido posible multiplicar yemas axilares, segmentos nodales y microestacas, además, se han empleado para la formación de embriones a partir de callos, multiplicar embriones somáticos, así como, para lograr germinación y conversión, en especies como bananos y plátanos (*Musa spp.*), cítricos (*Citrus*

deliciosa L.), café (*Coffea arabica* L.), piña (*Ananas comosus* L.) y árbol de caucho (*Hevea brasiliensis* L.). Estos recipientes de inmersión temporal han resultado ser más útiles para los procesos embriogénicos, pues para la organogénesis se requiere de recipientes de mayor tamaño (Escalona, 2006).

En los SIT intervienen una serie de factores físicos, mecánicos y ambientales que posibilitan obtener una mejor respuesta fisiológica y lograr una mayor eficiencia en el cultivo con respecto a los medios de cultivo líquidos estáticos (Escalona *et al.*, 2007). El tiempo y frecuencia de inmersión tienen gran importancia, tanto para la asimilación de los nutrientes por los explantes, como en la renovación de la atmósfera interna del recipiente de cultivo. Un manejo correcto del tiempo y frecuencia de inmersión en los SIT, ha ayudado a controlar la hiperhidricidad que puede aparecer en los explantes desarrollados en inmersión constante con el medio de cultivo líquido estático (Escalona, 2003; McAlister *et al.*, 2005).

La densidad de explantes por frasco de cultivo, así como el volumen de medio de cultivo por explante, son otros de los factores a tener presente para lograr la eficacia con el uso de los SIT (Berthouly y Etienne, 2005; Hempfling y Preil, 2005). El número de explantes que se coloca por cada frasco de cultivo tiene efecto sobre el desarrollo morfofisiológico de los materiales vegetales. El manejo de la densidad de explantes permite definir el aprovechamiento del volumen del frasco de cultivo, así como la capacidad productiva en las cámaras de crecimiento (Tisserat y Silman, 2000; Jiménez, 2005).

El control del medio de cultivo por explante permite establecer un equilibrio entre la asimilación de nutrientes por el explante y la secreción de compuestos al medio de cultivo provenientes de éstos (Hahn y Paek, 2005).

En cada protocolo que se desarrolle con los SIT es necesario ajustar cada uno de estos parámetros, pues pueden variar en dependencia del cultivo, variedad y sistema de regeneración que se emplee (Berthouly y Etienne, 2005).

2.5.3. Producción de microtubérculos en sistemas de cultivo automatizados

Los sistemas de cultivo automatizados presentan ventajas en comparación con el sistema de cultivo donde se emplea medio de cultivo líquido estático, tradicionalmente usado para la producción de microtubérculos. Estas se pueden resumir en mayor facilidad de escalado en este tipo de sistema de cultivo, el contacto del material vegetal con el medio de cultivo y la aeración forzada del medio de cultivo estimula la tasa de crecimiento e incrementa la biomasa de los microtubérculos. Además, es posible en los sistemas automatizados de cultivo realizar un control más preciso del suministro de nutrientes y de otros factores asociados con la tuberización (Takayama y Akita, 2005).

En el cultivo de la papa se han empleado diversos sistemas de cultivo automatizados y se han desarrollado varios protocolos de trabajo para la producción de microtubérculos. Por ejemplo, Akita y Takayama (1994) crearon un biorreactor simple con agitación en el medio de cultivo para la formación de microtubérculos de papa. Estos autores describieron la formación de los microtubérculos en dos fases de cultivo: primero ocurrió el crecimiento de los brotes, y luego la inducción y formación de microtubérculos, mediante la manipulación de factores físicos, microambientales y químicos. En esta fase emplearon un sistema de control semicontinuo del nivel del medio de cultivo y transfirieron el medio de cultivo del vaso de reserva al vaso de cultivo cada seis horas y lo retiraron a la hora, lo que permitió que todos los explantes fueran sumergidos completamente a intervalos. De esta forma se logró incrementar el número de microtubérculos formados por brotes. Estos ensayos les permitieron determinar que la respuesta en relación con la tuberización, es diferente en cultivos con el biorreactor en comparación con el cultivo en medios líquidos estáticos.

Más adelante, Akita y Ohta (1998) desarrollaron un sistema de cultivo simple y barato con el empleo de un biorreactor sin aeración forzada. Los explantes fueron colocados sobre un soporte de poliuretano para su cultivo durante la fase de crecimiento. Luego de un mes, el

medio de cultivo fue reemplazado por el medio de cultivo inductor de la tuberización, con 90,0 g.L⁻¹ de sacarosa. El vaso de cultivo fue colocado en un cilindro plástico, el cual fue continuamente rotado a 1,0 rpm durante el período de duración de esta segunda fase de cultivo (tres meses). El número y masa fresca total de los microtubérculos se incrementó en 1,45 y 2,43 unidades comparado con el cultivo sin rotación.

Por su parte, Teisson y Alvard (1999), evaluaron la producción de microtubérculos en tres cultivares de papa (Bintje, Ostara y Desirée), en un sistema nombrado “Doble RITA®”, que consistía en dos frascos de cultivo tipo RITA® de 1,0 L de capacidad, uno como reservorio de medio de cultivo y otro para el cultivo de los explantes, en ellos obtuvieron a las 10 semanas de cultivo 1,5; 2,3 y 1,4 microtubérculos por planta en cada genotipo. El 50,0% de los microtubérculos obtenidos en este tipo de sistema de cultivo presentaron una masa fresca superior a 0,5 g.

Por su parte, Jiménez *et al.* (1999) desarrollaron un protocolo para la producción de microtubérculos de papa en SIT con un frasco de cultivo de 4,0 L de capacidad. En el SIT con un tiempo de inmersión de cinco minutos cada tres horas la tuberización *in vitro* ocurrió en un mayor número de yemas axilares de la planta y se obtuvo un promedio de microtubérculos por explante para la variedad ‘Desiré’ de 2,8 y para ‘Atlantic’ de 3,1 después de nueve semanas de cultivo. El tamaño y la masa fresca de los microtubérculos fueron superiores a los obtenidos en medio de cultivo semisólido.

En este mismo cultivo, Ziv (2000) empleó un biorreactor muy barato para la proliferación de brotes y para obtener microtubérculos. Estuvo diseñado con una configuración cónica con un puerto de inoculación y cosecha, y con accesorios de usos múltiples. La agitación del medio de cultivo se realizó mediante flujo de aire y los brotes obtenidos después de 30 días de cultivo desarrollaron hasta 30 y 32 yemas axilares. Luego se sustituyó el medio de cultivo de crecimiento por el medio de cultivo de inducción de la tuberización y a las diez semanas de

cultivo, se obtuvo por cada 10,0 gMF colocada, hasta 36 microtubérculos. Estos presentaron una masa fresca que osciló entre 0,392 – 0,672 g.

Igualmente, Yu *et al.* (2000) informaron la producción de microtubérculos de papa en un biorreactor rotatorio. Al reemplazar el 75,0% del medio de cultivo cada dos semanas de cultivo, lograron aumentar el número de microtubérculos con una masa fresca superior a 1,0 g en comparación con el tratamiento donde no se reemplazó el medio de cultivo. Estos investigadores demostraron que mantener la concentración de sacarosa en el medio de cultivo es el principal factor a tener en consideración para obtener, en el biorreactor, microtubérculos de papa de mayor masa fresca.

Con el uso de SIT, Pérez (2001), obtuvo los mejores resultados para la tuberización *in vitro* de la papa, con el empleo de un tiempo de inmersión de dos minutos y con una frecuencia cada seis horas. Los microtubérculos se caracterizaron por presentar una masa fresca de 0,98 g y diez milímetros de diámetro.

En el SIT se conjugan factores que permiten la renovación de la atmósfera, un aporte más eficiente de elementos nutritivos, la eliminación de sustancias tóxicas, así como un mejor intercambio gaseoso (Teisson *et al.*, 1996; Berthouly y Etienne, 2005). Estas condiciones provocan en las plantas de papa un mayor desarrollo de yemas axilares durante el crecimiento, requisito indispensable para la formación posterior de microtubérculos, además de cambios fisiológicos favorables al proceso de tuberización *in vitro*. La estimulación en las yemas axilares inducidas por el SIT, provoca una mayor formación de microtubérculos, así como un aumento considerable en la calidad, expresada en masa fresca en relación con sistema de cultivo de propagación *in vitro* convencional (Jiménez, 2005).

Según Preil (2005) los nuevos desarrollos en análisis de imagen, robot, biorreactores, máquinas de encapsulación y un mejor control de la atmósfera interna en los recipientes de

cultivo, pueden contribuir a mejorar los sistemas automatizados para el cultivo de tejidos de plantas en el futuro.

En el cultivo del ñame, Salazar y Hoyos (2007), informaron la multiplicación y tuberización en SIT tipo RITA®. Ellos se limitaron a evaluar el efecto del tiempo y la frecuencia de inmersión, así como, la densidad de explantes por frasco de cultivo sobre la tasa de multiplicación. Estos investigadores obtuvieron como resultados que con un tiempo de inmersión de 10 minutos cada ocho horas se obtenía la formación de mayor número de entrenudos y mayor tamaño de las plantas a las cuatro semanas de cultivo. Sin previo estudio utilizaron ese mismo tiempo y frecuencia de inmersión para la formación de los microtubérculos. En cuanto a la densidad de explantes que evaluaron no se detectaron diferencias significativas para la multiplicación de los segmentos nodales y la formación de los microtubérculos, solo lograron obtener como promedio 0,85 microtubérculos por planta, con una masa fresca promedio de 0,24 g que no pudieron ser empleados como material vegetal de plantación en campo.

Por todo ello, se hace necesario trabajar en el desarrollo de protocolos para la formación de microtubérculos de ñame en sistemas de inmersión temporal que utilicen frascos de cultivo de mayor capacidad, en los cuales mediante la evaluación de variables fisiológicas y el conocimiento del contenido de los nutrientes del medio de cultivo por fase de cultivo, sea posible incrementar el número de microtubérculos formados por planta, así como producir microtubérculos con una masa fresca que permita su plantación directamente en condiciones de campo.

2.6. Empleo de los microtubérculos como material vegetal de plantación en campo

Balogun (2009), señaló que para el uso de los microtubérculos de ñame en la conservación e intercambio de germoplasma, así como para la propagación, es necesario desarrollar protocolos que permitan la producción de microtubérculos con una masa fresca que posibilite

reducir el período de dormancia, y permita el desarrollo post-brotación. Este investigador se refirió, a que las futuras investigaciones deben estar dirigidas a conocer la posible variación genética en las plantas obtenidas de los microtubérculos, en términos de conocer su aplicabilidad para la conservación de germoplasma y para la propagación. También, señaló que es necesario conocer sobre el vigor de las plantas en campo y sus posibilidades para la plantación directa en estas condiciones. Además, se debe investigar sobre el número de generaciones que se necesitarían para que los microtubérculos produzcan tubérculos comparables a los tubérculos "semillas". Otro aspecto será, conocer la supervivencia de las plantas de los microtubérculos en comparación con las plantas *in vitro*. Así como, los beneficios económicos de la conservación y de la propagación a partir de los microtubérculos. Hasta el presente existen escasas investigaciones sobre la respuesta de los microtubérculos de ñame en condiciones de campo.

En relación con el cultivo de la papa, Ranalli (1997) ha señalado que el tamaño y masa fresca de los microtubérculos está correlacionado con la duración del período de dormancia. Según este investigador, los tubérculos pequeños, menores de 0,5 gMF, experimentaron deshidratación cuando fueron almacenados por un período de tiempo prolongado. En la investigación realizada por este autor se plantaron en campo, microtubérculos con una masa fresca superior a 0,25 g, los que brotaron lentamente debido a la poca cantidad de sustancias de reservas. En ellos sólo emergió un tallo por planta, el cual luego se ramificó. Las plantas de estos microtubérculos desarrollaron un escaso sistema radicular. El poco desarrollo foliar de las plantas de los microtubérculos, limitó la cantidad de radiación solar que puede ser interceptada y disminuyó el crecimiento y la producción de materia seca. Esto provocó la obtención de bajos rendimientos en las plantas procedentes de microtubérculos en comparación con los tubérculos "semillas", aspecto que limitó su incorporación en los programas de producción de semillas por métodos biotecnológicos (Kawakami *et al.*, 2005).

El tamaño y la masa fresca de los microtubérculos destinados para la plantación en campo determina en gran medida la respuesta de los mismos bajo esas condiciones de cultivo. Yu *et al.* (2000) han señalado que se requieren protocolos que produzcan microtubérculos que presenten como mínimo una masa fresca de 0,5 g para que puedan ser utilizados en los programas de producción de semillas de papa.

Peréz (2001), plantó directo a campo los microtubérculos de papa provenientes del SIT. Estos presentaban una masa fresca promedio de 1,26 g y un diámetro promedio de 11,40 mm. Las plantas que se obtuvieron de los microtubérculos mostraron una mayor altura y número de tallos por planta en comparación con las plantas procedentes de la micropropagación. Luego de cosechados ambos tratamientos, no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de minitubérculos por planta. Sin embargo, las plantas procedentes de los microtubérculos presentaron valores superiores en cuanto al peso y diámetro de los tubérculos producidos.

La formación de microtubérculos en el cultivo del ñame constituye una valiosa alternativa para la propagación de esta especie. Sin embargo, los protocolos desarrollados hasta el presente no pueden ser aplicados a escala comercial, debido fundamentalmente al bajo número de microtubérculos formados por brote, así como porque los microtubérculos formados se han caracterizado por una masa fresca inferior a 0,5 g, lo cual ha limitado el empleo de estos para la plantación directa en condiciones de campo, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas.

El empleo de sistemas de cultivo semi-automatizado puede constituir una alternativa de gran interés para la formación de microtubérculos de ñame que permita emplearlos como material vegetal de plantación directa en campo. De esta manera, se contribuiría al desarrollo de un esquema sostenible de producción de semilla mediante métodos biotecnológicos.

3. MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT); ubicado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. Este Instituto se encuentra situado en los 22° 35' de latitud norte y los 80° 18' de longitud oeste, a 40 metros sobre el nivel del mar (msnm) y ocupa un área experimental de 166 hectáreas. Desde el punto de vista climático, se caracteriza por una temperatura media anual de 24,4°C, una humedad relativa del 80% y un valor medio anual de precipitaciones de 1374,9 mm. El trabajo se desarrolló durante el período comprendido entre septiembre del 2003 y Julio del 2009.

Procedimientos generales de la investigación

Medios de cultivo

Para el desarrollo de los experimentos, se empleó como medio de cultivo basal, el compuesto por las sales inorgánicas y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS), con cisteína (20 mg.L⁻¹).

El pH de los medios de cultivo se ajustó a 5,7 con NaOH 0,5 mol/L y/o HCl 0,5 mol/L antes de la esterilización en autoclave.

Los medios de cultivo y sistemas de cultivos que se emplearon en los experimentos se esterilizaron por vapor en autoclave vertical (BK-75) a 121°C y 1,20 kg.cm⁻². El tiempo de esterilización varió en dependencia del volumen de medio de cultivo a esterilizar, según información técnica de la compañía SIGMA (1991).

Instrumental

La cristalería y otros accesorios que se emplearon en la manipulación del material vegetal se esterilizaron en una estufa (SUTJESKA) a 180°C durante dos horas. El instrumental utilizado (bisturíes, pinzas y espátulas) se desinfectaron en un esterilizador eléctrico modelo (DENT-EQ) que permaneció dentro de la cabina de flujo laminar horizontal (FLUFRANCE), donde se

realizaron las operaciones de manejo del material vegetal (establecimiento), cambios de medios de cultivo y montaje de los sistemas de cultivo.

Material vegetal

Se utilizó el clon de ñame ‘Pacala Duclos’ procedente del Banco de Germoplasma del INIVIT. Los tubérculos de cada planta típica del clon fueron previamente seleccionados por las características morfológicas según la lista de descriptores para la especie (IPGRI/IITA., 1997) y sanidad. Estos fueron seccionados en fracciones de 50 gMF. Las fracciones de los tubérculos se plantaron en bolsas de polietileno que contenía compost como sustrato y posteriormente se cultivaron en un aislador (casa de cultivo) por nueve meses.

Se tomaron a los 45 días de cultivo hojas de los brotes de cada una las fracciones de tubérculos y fueron diagnosticados mediante un kit ELISA indirecto según el juego de reactivos comercializado por la compañía AGDIA para el género de los potivirus, siguiendo instrucciones del fabricante, el límite de corte se determinó como el duplo de la media de los valores de absorbancia (VA) de los controles negativos aportados por el mismo. El diagnóstico se realizó en el Laboratorio de Manejo de Plagas del INIVIT.

Establecimiento y multiplicación *in vitro* de los segmentos nodales

Para el establecimiento solo se tomaron los tallos de las fracciones de los tubérculos procedentes de plantas previamente certificada como libre de patógenos virales. Para garantizar la homogeneidad del material vegetal inicial el establecimiento se realizó a partir de los tallos de las fracciones de los tubérculos procedentes de una planta.

Los tallos se dividieron en segmentos nodales con una yema axilar de aproximadamente tres centímetros de longitud, de forma tal que la yema axilar quedara ubicada en el centro. Posteriormente los segmentos nodales se lavaron con detergente comercial ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$), se enjuagaron con abundante agua y posteriormente en la cabina de flujo laminar se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2,5% (v/v) por 10 minutos.

Transcurrido ese tiempo se enjuagaron con agua desionizada estéril cinco veces (Medero *et al.*, 1999).

En la fase de establecimiento se utilizó el medio de cultivo basal MS que contenía, KIN (1,0 mg.L⁻¹), ANA (0,01 mg.L⁻¹) y 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa (Perea, 2001). Esta fase de cultivo se desarrolló durante un período de 30 días.

En la fase de multiplicación se empleó el medio de cultivo basal MS con 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa y cada 35 días de cultivo se realizó el subcultivo, al seccionar la planta *in vitro* en segmentos nodales con una yema axilar según la metodología propuesta por Medero *et al.* (1999).

En ambas fases de cultivo se colocó un segmento nodal con una yema axilar por tubo de ensayo (diámetro 25 mm y longitud 150 mm) que contenía 10,0 mL de medio de cultivo en estado semisólido con 5,0 g.L⁻¹ de Agar-E (BIOCEN).

Las condiciones de cultivo que se emplearon para el establecimiento y multiplicación de los segmentos nodales fueron las siguiente: cámara de cultivo a 25±2,0°C e iluminación artificial mediante lámparas blancas fluorescentes (Sylvania, Daylight F40T12/D 40 W) que proporcionaron una intensidad de 60 μmol.m⁻².s⁻¹. El fotoperíodo correspondió a 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad.

Tuberización *in vitro*

La tuberización *in vitro* se desarrolló en dos etapas de cultivo:

- Etapa de crecimiento de las plantas *in vitro*. Se emplearon como explantes segmentos nodales de aproximadamente 1,0 cm de longitud con una yema axilar, procedentes de plantas *in vitro* en tercer subcultivo de la fase de multiplicación (Figura 1). Se utilizó el medio de cultivo basal MS con 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa y las condiciones de cultivo descritas para la fase de establecimiento y multiplicación de

los segmentos nodales. Esta etapa de cultivo se desarrolló durante un período de seis semanas.



Figura 1. Segmentos nodales a partir de los cuales se obtuvieron las plantas *in vitro* empleadas para la formación de microtubérculos de ñame clon ‘Pacala Duclos’.

- Etapa de formación de microtubérculos. Se utilizó el medio de cultivo basal MS con 100 g.L^{-1} de sacarosa, las condiciones de cultivo fueron: $23 \pm 2,0^\circ\text{C}$ y oscuridad, y se desarrolló durante un período de 18 semanas de cultivo, según resultados previos obtenidos por el autor en medio de cultivo líquido estático y no mostrados en el presente trabajo.

Evaluaciones que se realizaron en los experimentos *in vitro*

En el Centro de Bioplasmas de la Universidad de Ciego de Ávila, se realizaron las mediciones de la actividad fotosintética, transpiración y conductancia estomática, así como la determinación del contenido de almidón y de pigmentos fotosintéticos.

Determinación de los indicadores morfológicos

Para medir la longitud total de la planta (cm) se empleó una regla milimetrada y para el diámetro de los microtubérculos (cm) se utilizó un pie de rey. Para determinar en las plantas *in vitro* y en los microtubérculos la masa fresca expresada en gramos de masa fresca (gMF)

y masa seca expresada en gramos de masa seca (gMS), se empleó una balanza analítica (SARTORIUS). Previo a determinar la masa seca, las plantas *in vitro* y los microtubérculos fueron colocados en una estufa (SUTJESKA) a 70°C hasta que se estabilizó la masa seca. Además, se calculó el porcentaje del contenido de la masa seca.

Determinación de la actividad fotosintética, transpiración y conductancia estomática

Se utilizó la hoja más joven completamente expandida de las plantas *in vitro* de ñame para las mediciones de la actividad fotosintética, transpiración total y conductancia estomática. Estas determinaciones se realizaron en un equipo CIRAS-2 (Sistema Portátil de Fotosíntesis, Europa, PP Systems, UK) acoplado a una cubeta universal (PLC6) cuatro horas después del inicio del fotoperíodo. El área de la cubeta se cubrió completamente con la hoja más joven completamente expandida (2,5 cm²). Por tratarse de una planta C3, se escogió un valor de radiación fotosintéticamente activa (RFA) de 600 W.m⁻². Para el caso de la concentración de dióxido de carbono y la humedad relativa se emplearon los valores ambientales 375 μmol.mol⁻¹ y 87% respectivamente. Se realizaron las determinaciones en cinco plantas con diez mediciones en cada una para un total de 50 mediciones por repeticiones. En el caso de la fotosíntesis los valores se expresaron en μmol de CO₂ m⁻².s⁻¹, para la transpiración en mmol de H₂O m⁻².s⁻¹ y conductancia estomática en μmol H₂O.m⁻².s⁻¹.

Determinación del contenido de almidón

Para la determinación del contenido de almidón en hojas y en microtubérculos se tomaron tres muestras de 1,0 gMF y se maceraron en mortero con nitrógeno líquido. En cada muestra se realizaron tres determinaciones para un total de nueve determinaciones por repeticiones. Los azúcares se extrajeron en 5,0 mL de etanol 80%. El extracto se centrifugó 20 minutos a 10 000g y 4°C al vacío en centrífuga Beckman (JB-21). El precipitado se resuspendió con KOH 0.2 mol.L⁻¹ para su hidrólisis alcalina durante 12 horas a 90°C. Posteriormente se disolvió la enzima β-amilo glucosidasa (EC 3.2.1.3) (SIGMA) en citrato de sodio y se añadió

para la degradación enzimática a 40 °C durante dos horas (Thomas *et al.*, 1983). La cuantificación del almidón se realizó basada en una curva patrón de almidón de papa (SIGMA) previamente construida siguiendo el mismo procedimiento descrito. Los valores del contenido de almidón se expresaron en mg.gMF^{-1} .

Determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos

Para la determinación de los pigmentos fotosintéticos se tomaron tres muestras de 1,0 g, a las cuales se le realizaron tres determinaciones para un total de nueve determinaciones por repeticiones. Las clorofilas *a* y *b* se extrajeron según el protocolo descrito por Porra (2002). Para la cuantificación de las clorofilas *a*, *b* y totales se utilizó el procedimiento descrito por Lichtenthaler (1987).

Determinación de la concentración de azúcares reductores en el medio de cultivo

Para la determinación de la concentración de los azúcares reductores en el medio de cultivo, se tomó una muestra de 10,0 mL de medio de cultivo. Para la valoración de la muestra: en un erlenmeyers de 500 mL se añadieron 5,0 mL de reactivo Fehling A + 5,0 mL de reactivo Fehling B + 10,0 mL de la muestra + 39 mL de agua destilada hasta llegar a 59 mL, luego se colocó en la hornilla eléctrica (esta estaba fría), se esperó a que empezara a burbujear y luego se contaron dos minutos exactos, transcurrido el tiempo se adicionaron 0,5 mL de azul de metileno, se abrió la llave de la bureta donde esta la solución patrón de azúcar (glucosa), se dejó caer solo una gota de la misma sobre la muestra y se comenzó a valorar, se observó el cambio de coloración de azul a rojo ladrillo, cuando esto sucedió se cerró la llave y se midió en la bureta el valor del gasto de azúcar consumido y se calculó según la fórmula: concentración de azúcares reductores = $52,5 - (\text{volumen consumido en la valoración de la muestra} \times \text{concentración del patrón})$, descrita en el Manual de técnicas analíticas (ICIDCA 1974).

Determinación del contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo

El contenido de nitrógeno (N) se determinó por el método colorimétrico de Nessler y el de fósforo (P) por el método colorimétrico de metavanato de amonio, según norma ramal NRAG 564 (1982). Las lecturas de las muestras se realizaron en un espectrofotómetro Spekoll 11. El potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg), hierro (Fe), cobre (Cu), cobalto (Co), manganeso (Mn) y zinc (Zn) se determinaron por diluciones en dependencia de la concentración de los mismos en la muestra, según la metodología de espectroscopía de absorción atómica (Smith y Scherk, 1972). Se tomaron dos muestras con tres determinaciones para un total de seis determinaciones por repeticiones. Las lecturas de las muestras se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica sp-9, Pye Unicam.

Análisis estadísticos

Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico *SPSS* ver. 13.0, para el sistema operativo *Windows*. Se aplicaron análisis no paramétricos en los casos que los datos no cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. En cada experimento se detallan las pruebas que se realizaron.

3.1. Efecto del tipo de sistema de cultivo en medio líquido sobre la tuberización *in vitro*

Este experimento se desarrolló con el objetivo de evaluar la influencia de tres sistemas de cultivo en medio líquido sobre la tuberización *in vitro* de ñame.

Sistema de cultivo I: Sistema de inmersión temporal (SIT)

El sistema de inmersión temporal utilizado (Figura 2), estuvo compuesto por dos frascos de cultivo tipo *Clearboys* (Nalgene, E.U.A) de 10,0 L de capacidad, uno para el crecimiento de las plantas 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 insertados en la tapa. En la parte interna se colocó una manguera 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 controlar el tiempo y frecuencia de la inmersión. A la entrada de los frascos de cultivo se colocaron filtros hidrofóbicos (0,22 μm , MIDISART 2000, SARTORIUS AG, Alemania) para garantizar la esterilidad del aire. La presión del aire de 1,0 $\text{kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ proveniente de un compresor, fue regulada por un manómetro. Se realizaron inmersiones de diez minutos de duración cada tres horas (ocho inmersiones por día) según resultados previos no mostrados en este trabajo.



Figura 2. Sistemas de inmersión temporal empleados en este trabajo.

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

El sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo (Figura 3), consistió en un frasco de cultivo tipo *Clearboys* (Nalgene, E.U.A) de 10,0 L 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 se insertó en la tapa mediante conectores, 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 μm , MIDISART 2000, SARTORIUS AG, Alemania) para garantizar la esterilidad del aire proveniente del compresor que permitió un flujo de aire de 25 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.



Figura 3. Sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo.

3. Sistema de cultivo III: Frasco de cultivo con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna (SLE).

El sistema con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna (Figura 4), consistió en un frasco de cultivo tipo *Clearboys* (Compañía Nalgene, E.U.A) de 10,0 L de capacidad, en el cual se colocaron los segmentos nodales y el medio de cultivo líquido estático. El frasco de cultivo fue cerrado con una tapa, en los conectores de entrada y salida de la tapa se colocaron filtros hidrofóbicos (0,22 μm , MIDISART 2000, SARTORIUS AG, Alemania) para garantizar la esterilidad.



Figura 4. Frasco de cultivo con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna.

Se utilizó el medio de cultivo y las condiciones de cultivo para el crecimiento de las plantas *in vitro*, descritas en los procedimientos generales.

Se colocaron 100 segmentos nodales con una yema axilar cada uno y un volumen de 30 mL de medio de cultivo por segmento nodal en cada sistema de cultivo estudiado, para un volumen total de 3,0 L de medio de cultivo. Luego de finalizada la etapa de crecimiento de las plantas se colocó un volumen de 30 mL de medio de cultivo de tuberización por planta *in vitro*, para un volumen total de 3,0 L de medio de cultivo, el cual no se renovó en las 18 semanas de cultivo.

Este experimento tuvo siete repeticiones por cada sistema de cultivo, de ellas se seleccionaron al azar tres repeticiones para las evaluaciones de indicadores morfológicos y fisiológicos en la etapa de crecimiento de las plantas y las cuatro restantes se emplearon para las evaluaciones de la fase de formación de microtubérculos.

3.1.1. Evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos en la etapa de crecimiento de las plantas

Al finalizar la etapa de crecimiento de las plantas (seis semanas de cultivo), se seleccionaron al azar 30 plantas en cada una de estas tres repeticiones, para un total de 90 plantas por sistema de cultivo y se evaluó: longitud total de la planta (cm), número de yemas axilares, masa fresca (gMF) y masa seca (gMS) por planta. Además, se contó el número total de plantas con hiperhidricidad.

También, al finalizar la etapa de crecimiento de las plantas se evaluó: fotosíntesis neta, conductancia estomática y transpiración total, para esto se seleccionaron al azar cinco plantas en cada una de estas tres repeticiones para un total de 15 plantas por sistema de cultivo, en cada una de ellas se realizaron diez mediciones para un total de 150 mediciones por sistema de cultivo.

Para la determinación del contenido de pigmentos fotosintéticos (Clorofila *a*, *b* y totales), se tomaron tres muestras en cada una de estas tres repeticiones para un total de nueve muestras por sistema de cultivo, en cada una de ellas se realizaron tres determinaciones para un total de 27 determinaciones por sistema de cultivo, similar procedimiento para la toma de las muestras, número de repeticiones y determinaciones por sistema de cultivo se siguió para la determinación del contenido de almidón.

Los datos relativos a la longitud total de la planta, número de yemas axilares, masa fresca y masa seca de las plantas, así como el número total de plantas con hiperhidricidad fueron analizados estadísticamente mediante una prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis*.

La comparación de las medias del contenido de clorofila *a*, *b*, totales, fotosíntesis neta, conductancia estomática y transpiración total, y contenido de almidón en las hojas se realizaron por un análisis estadístico de varianza simple y se empleó la prueba de *Tukey*.

3.1.2. Evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos en la etapa de formación de microtubérculos

Al finalizar la etapa de formación de los microtubérculos (18 semanas de cultivo), se seleccionaron al azar 30 microtubérculos en cada una de las repeticiones por sistema de cultivo, para un total de 120 microtubérculos por sistema de cultivo y se les determinó: la masa fresca (gMF), masa seca (gMS), y se midió el diámetro (mm).

Además, se cuantificó el número total de microtubérculos formados por sistema de cultivo, el número de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g (se estableció este criterio de selección porque microtubérculos con masa fresca inferior a esta, presentaron resultados poco satisfactorios en cuanto a la brotación y supervivencia en campo según estudios previos realizados por el autor y no mostrados en este trabajo) y el número de microtubérculos hiperhidratados.

También, al finalizar la etapa de formación de los microtubérculos, en los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g, se calculó el porcentaje del contenido de la masa seca (%). Se seleccionaron al azar 25 de ellos por repeticiones para un total de 100 microtubérculos por sistema de cultivo, y se determinó el contenido de almidón (mg.gMF^{-1}), para esto se tomaron dos muestras por repeticiones para un total de ocho muestras por sistema de cultivo, en cada una de ellas se realizaron tres determinaciones para un total de 24 determinaciones por sistema de cultivo.

Los datos relativos a la masa fresca, masa seca y diámetro de los microtubérculos, así como el porcentaje del contenido de la masa seca de los microtubérculos fueron analizados estadísticamente mediante una prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis*.

La comparación de las medias del número total de microtubérculos, el número de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g y el número de microtubérculos

hiperhidratados, así como el contenido de almidón se realizó por un análisis estadístico de varianza simple y se empleó la prueba de *Tukey*.

3.1.3. Determinación de azúcares reductores y nutrientes minerales en el medio de cultivo del sistema de inmersión temporal

Con el objetivo de relacionar la respuesta en cuanto a la tuberización *in vitro* en el sistema de inmersión temporal con el contenido final de azúcares reductores y nutrientes minerales en el medio de cultivo, se realizaron al medio de cultivo tanto en la etapa de crecimiento de las plantas (seis semanas de cultivo) como en la de formación de microtubérculos (18 semanas de cultivo) las evaluaciones siguientes: se determinó al final de cada una de ellas la concentración de azúcares reductores, y se determinó al inicio y al final de cada una de ellas el contenido de nutrientes minerales (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn y Zn).

3.2. Efecto de las condiciones de cultivo en el sistema de inmersión temporal sobre la formación de microtubérculos

3.2.1. Efecto del tiempo de inmersión

Con el objetivo de incrementar el número y la masa fresca de los microtubérculos de ñame a formar en el SIT, se determinó el efecto de cuatro tiempos de inmersión, 10,0 (Control); 15,0; 20,0 y 25,0 minutos cada tres horas (ocho inmersiones por día).

Cada tratamiento tenía 100 plantas *in vitro* por SIT que habían experimentado un proceso de crecimiento previo de seis semanas de cultivo. Se colocó 30 mL de medio de cultivo de tuberización por planta *in vitro*, para un volumen total de 3,0 L de medio de cultivo/SIT. Este experimento tuvo cinco repeticiones por cada tratamiento.

Al finalizar la etapa de formación de los microtubérculos (18 semanas de cultivo), se cuantificó el número total de microtubérculos formados por SIT y el número de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g por SIT. También se determinó

el contenido de masa seca (%) de los microtubérculos, para esto se seleccionaron al azar 20 de ellos por repeticiones para un total de 100 microtubérculos por tratamiento.

La comparación de las medias del número de microtubérculos total y microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 gMF se realizaron por un análisis de varianza simple y se empleó la prueba de *Tukey*. Los datos relativos al porcentaje del contenido de masa seca fueron analizados estadísticamente mediante una prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis*.

3.2.2. Efecto de la frecuencia de inmersión

Con el objetivo de incrementar el número y la masa fresca de los microtubérculos de ñame a formar en el SIT, se determinó el efecto de cuatro frecuencias de inmersión, una cada 3,0 (Control); 6,0; 12,0 y 24 horas, se empleó el mejor tiempo de inmersión obtenido en el epígrafe 3.2.1.

Cada tratamiento tenía 100 plantas *in vitro* por SIT que habían experimentado un proceso de crecimiento previo de seis semanas de cultivo. Se colocó un volumen de medio de cultivo según lo descrito en el epígrafe 3.2.1.

Las condiciones experimentales, el número de repeticiones por tratamiento, el momento de las evaluaciones, las variables evaluadas, el procedimiento para la evaluación y el análisis estadístico que se realizó por variable fueron similares a lo que se explicó en el epígrafe 3.2.1.

3.2.3. Efecto del volumen de medio de cultivo por planta cultivada *in vitro*

Este experimento se desarrolló con el objetivo de incrementar el número y la masa fresca de los microtubérculos de ñame a formar en el SIT. Para el desarrollo del experimento se determinó el efecto de cuatro volúmenes 15, 30 (Control), 60 y 90 mL de medio de cultivo por planta cultivada *in vitro*.

Cada tratamiento tenía 100 plantas *in vitro* por SIT que habían experimentado un proceso de crecimiento previo de seis semanas de cultivo. Se utilizó el mejor tiempo y frecuencia de

inmersión obtenido como resultado para las variables evaluadas en los epígrafes 3.2.1. y 3.2.2. respectivamente.

Para mantener la homogeneidad en cuanto al tiempo de contacto del medio de cultivo con las plantas *in vitro* de ñame se varió la presión del aire proveniente del compresor según el volumen de medio de cultivo.

Las condiciones experimentales, el número de repeticiones por tratamiento, el momento de las evaluaciones, las variables evaluadas, el procedimiento para la evaluación y el análisis estadístico que se realizó por variable fueron similares a lo que se explicó en el epígrafe 3.2.1.

3.2.4. Efecto de las renovaciones del medio de cultivo

Con el objetivo de incrementar la masa fresca de los microtubérculos de ñame a formar en el SIT, se determinó el efecto del número de renovaciones del medio de cultivo durante la etapa de formación de los microtubérculos, se evaluaron los tratamientos siguientes:

Tratamientos

- A Sin renovación (Control)
- B Una renovación de medio de cultivo (a las nueve semanas de cultivo)
- C Dos renovaciones de medio de cultivo (a las seis y doce semanas de cultivo)
- D Tres renovaciones de medio de cultivo (a las cinco, diez y 15 semanas de cultivo)
- E Cuatro renovaciones de medio de cultivo (a las cuatro, ocho, 12 y 16 semanas de cultivo)
- F Cinco renovaciones de medio de cultivo (a las tres, seis, nueve, 12 y 15 semanas de cultivo)

Cada tratamiento tenía 100 plantas *in vitro* por SIT que habían experimentado un proceso de crecimiento previo de seis semanas de cultivo. En el desarrollo del experimento se utilizó el

mejor tiempo y frecuencia de inmersión obtenido como resultado para las variables evaluadas en los epígrafes 3.2.1 y 3.2.2 respectivamente. Así como el volumen de medio de cultivo por planta *in vitro* seleccionado en el epígrafe 3.2.3.

Este experimento tuvo cuatro repeticiones por cada tratamiento.

Transcurrida la etapa de formación de los microtubérculos (18 semanas de cultivo), se clasificó y se cuantificó el número de microtubérculos formados según su masa fresca: de 0,5 - 0,9 g; de 1,0 - 2,9 g; e igual y mayor de 3,0 g.

La comparación de las medias del número de microtubérculos clasificados según su masa fresca se realizó por un análisis estadístico de varianza simple, y se empleó la prueba de *Tukey*.

3.3. Evaluación de la respuesta morfoagronómica de las plantas obtenidas de los microtubérculos que se produjeron en SIT y de su primera multiplicación en campo

3.3.1. Influencia de la masa fresca de los microtubérculos sobre su brotación, y sobre la supervivencia y caracteres morfoagronómicos de las plantas derivadas de estos

El presente experimento tuvo como objetivo estudiar el efecto de la masa fresca de los microtubérculos que se produjeron en SIT sobre su brotación, y sobre la supervivencia y el posterior desarrollo de las plantas derivadas de ellos en campo. Se plantaron las variantes experimentales siguientes:

- Microtubérculos con una masa fresca de 0,5 – 0,9 g.
- Microtubérculos con una masa fresca de 1,0 – 2,9 g.
- Microtubérculos con una masa fresca igual o mayor de 3,0 g.
- Plantas *in vitro* previamente aclimatizadas con una longitud del tallo de 30 cm y al menos cuatro hojas.
- Coronas de tubérculo, con una masa fresca de 50 g, propagación convencional (Control).

Previo a la plantación en campo, la inducción de la brotación en los microtubérculos y las coronas de tubérculos se logró sumergiéndolos en una solución de 0,1 μM de ácido jasmónico durante 10 minutos (Bazabakana *et al.*, 1999). Las plantas *in vitro* en la fase de aclimatización fueron asperjadas con similar solución. Posteriormente los microtubérculos se colocaron en una cámara de crecimiento (RUMED, Alemania) a la oscuridad durante cuatro semanas de cultivo a $25\pm 2,0^{\circ}\text{C}$ y una humedad relativa de 90%, mientras que las coronas de tubérculos se colocaron en lugar fresco a la sombra.

El diseño experimental que se empleó fue un bloque al azar, con cinco parcelas experimentales por tratamiento. Las parcelas experimentales estuvieron formadas por cuatro hileras de montículos, con diez montículos por cada hilera, para un total de 40 montículos por parcela y 200 montículos por tratamiento.

El experimento se plantó en un suelo Pardo Sialítico Cálcico Carbonatado (Hernández *et al.*, 1999). La plantación en campo se realizó el 15 de Abril del año 2006. La distancia de plantación fue de 1,00 x 1,00 m. El riego y las demás atenciones culturales, así como el control de plagas y enfermedades se realizaron según el Instructivo Técnico del cultivo del ñame (MINAG, 2008).

A las cuatro semanas de cultivo en campo se cuantificó el número de microtubérculos que brotaron por parcelas y se determinó el porcentaje. A las seis semanas de cultivo se cuantificó la supervivencia de cada uno de las plantas de los materiales de plantación por parcelas y se determinó el porcentaje.

Evaluación de caracteres cualitativos

La totalidad de la población se evaluó según los caracteres cualitativos morfológicos citados en la lista de descriptores para *Dioscorea alata* L. (IPGRI/IITA., 1997), (ver Anexo 1).

Evaluación de caracteres cuantitativos

Para la evaluación se seleccionaron 10 plantas de los montículos internos de cada parcela y se evaluaron las variables siguientes: número de tallos por planta, longitud de los tallos (m), número de tubérculos/planta y masa fresca de los tubérculos (kg)/planta

A las 24 semanas de plantación se evaluaron los caracteres cualitativos y cuantitativos relacionados con el follaje y a las 36 semanas de desarrollo del cultivo (en la cosecha) los relacionados con los tubérculos.

Los datos relativos al porcentaje de brotación de los microtubérculos, porcentaje de supervivencia de las plantas, número de tallos por planta, longitud de los tallos, número de tubérculos/planta y masa fresca de los tubérculos/planta se analizaron estadísticamente mediante una prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis*.

3.3.2. Evaluación morfoagronómica de las plantas procedentes de la primera multiplicación vegetativa de los microtubérculos producidos en SIT

Este experimento se realizó con el objetivo de evaluar la respuesta morfoagronómica de las plantas procedentes de la primera multiplicación vegetativa de los microtubérculos producidos en SIT. Se plantaron como variantes experimentales las siguientes:

- Secciones de tubérculos con una masa fresca de 100 g procedentes de las plantas obtenidas de los microtubérculos.
- Secciones de tubérculos con una masa fresca de 100 g procedentes de las plantas propagadas *in vitro*.
- Sección de tubérculo, con una masa fresca de 100 g, propagación convencional (Control).

El diseño experimental, las parcelas experimentales y el número de montículo por tratamiento se realizaron según lo descrito en el epígrafe 3.3.1. Se plantaron 200 secciones de tubérculos por tratamiento.

Estas poblaciones también se plantaron en un suelo Pardo Sialítico Cálcico Carbonatado (Hernández *et al.*, 1999). La plantación en campo se realizó el 10 de Abril del año 2007. La distancia de plantación fue de 1,00 x 1,00 m. El riego y las demás atenciones culturales, así como el control de plagas y enfermedades se realizaron según el Instructivo Técnico del cultivo del ñame (MINAG, 2008).

A las 24 semanas de plantación se evaluaron los caracteres cualitativos y cuantitativos relacionados con el follaje y a las 36 semanas de desarrollo del cultivo (en la cosecha) los relacionados con los tubérculos.

Los datos relativos al número de tallos por planta, longitud de los tallos, número de tubérculos/planta y masa fresca de los tubérculos/planta se analizaron estadísticamente mediante una prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis*.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Efecto del tipo de sistema de cultivo en medio líquido sobre la tuberización *in vitro*

4.1.1. Evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos en la etapa de crecimiento de las plantas

El tipo de sistema de cultivo influyó de forma significativa en el crecimiento de las plantas de ñame a partir de los segmentos nodales. En los sistemas de cultivo con renovación forzada de la atmósfera interna del frasco de cultivo (SIT y SIC) se obtuvieron resultados superiores en los indicadores morfológicos de las plantas en comparación con las que se cultivaron en el sistema de cultivo con renovación pasiva de la atmósfera interna del frasco de cultivo (SLE). En los SIT se obtuvieron a las seis semanas de cultivo los mayores valores en cuanto a longitud total, número de yemas axilares, masa fresca y seca por planta con diferencias significativas respecto a las que crecieron en el SIC y en el SLE (Tabla 1). Las plantas cultivadas en el SIT se caracterizaron por una coloración verde intensa y por presentar hojas expandidas bien desarrolladas (Figura 5).



Figura 5. Frasco de cultivo con plantas de ñame del clon 'Pacala Duclos' a las seis semanas de cultivo, obtenidas en el sistema de inmersión temporal a partir de los segmentos nodales.

Tabla 1. Efecto del tipo de sistema de cultivo sobre el crecimiento de las plantas de ñame del clon ‘Pacala Duclos’ a las seis semanas de cultivo.

Variables	SIT		SIC		SLE	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
Longitud total de la planta (cm)	20,80	74,30 a	18,60	46,70 b	12,20	15,50 c
Número de yemas axilares/planta	8,60	70,70 a	7,80	50,30 b	5,60	15,50 c
Masa fresca (gMF)/planta	2,10	75,50 a	1,85	45,50 b	1,39	15,50 c
Masa seca (gMS)/ planta	0,18	75,50 a	0,13	45,50 b	0,08	15,50 c
Número de plantas con hiperhidricidad/ sistema de cultivo	3,40	15,50 c	6,60	45,50 b	9,40	75,50 a

Rangos medios con letras no comunes en una misma fila difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$ ($n=90$) y para el número de planta con hiperhidricidad/sistema de cultivo ($n=7$).

Leyenda: SIT: Sistema de inmersión temporal, SIC: Sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo, SLE: Sistema con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna.

La respuesta en cuanto al desarrollo de las plantas de ñame cultivadas en el SIT en comparación con las cultivadas en el resto de los sistemas de cultivo se corroboró al evaluar diferentes variables fisiológicas. En los sistemas de cultivo con renovación forzada de la atmósfera interna del frasco de cultivo (SIT y SIC) se obtuvieron resultados superiores en los indicadores fisiológicos de las plantas en comparación con las que se cultivaron en el sistema de cultivo con renovación pasiva de la atmósfera interna del frasco de cultivo (SLE). En los SIT se obtuvieron a las seis semanas de cultivo los mejores resultados en cuanto a contenido de pigmentos fotosintético (Clorofilas *a*, *b* y totales), fotosíntesis neta, transpiración total, relación en cuanto a fotosíntesis neta y transpiración total, conductancia estomática y contenido de almidón en las hojas (Tabla 2).

Tabla 2. Variables fisiológicas evaluadas en las plantas de ñame del clon ‘Pacala Duclos’ que crecieron en los sistemas de cultivo por seis semanas.

Variables	SIT	SIC	SLE	EE±
Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$)	46,22 a	30,33 b	15,66 c	0,71
Clorofila <i>b</i> ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$)	29,77 a	21,22 b	10,66 c	0,63
Clorofilas totales ($\mu\text{g.gMF}^{-1}$)	75,99 a	51,55 b	26,32 c	0,94
Fotosíntesis neta ($\mu\text{mol CO}_2.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	15,30 a	10,02 b	4,10 c	0,16
Transpiración total ($\text{mmol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	5,97 c	6,76 b	11,68 a	0,07
Fotosíntesis/Transpiración	2,56 a	1,48 b	0,35 c	0,43
Conductancia estomática ($\mu\text{mol H}_2\text{O}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	457,00 c	518,00 b	1160,00 a	9,32
Contenido de almidón en las hojas (mg.gMF^{-1})	45,77 a	41,22 b	24,22 c	0,98

Medias con letras no comunes en una misma fila difieren según prueba de *Tukey* para $p < 0,05$ ($n=150$), para Clorofila (*a*, *b* y *totales*) y contenido de almidón en las hojas ($n=27$).

Leyenda: SIT: Sistema de inmersión temporal, SIC: Sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo, SLE: Sistema con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna, EE± Error estándar.

La mayor actividad fotosintética de las plantas en los SIT y en consecuencia la posibilidad de que se induzca en estas mayor crecimiento fotomixotrófico se explica por el propio funcionamiento de este tipo de sistema de cultivo, ya que durante un período de tiempo las plantas no están en contacto con el medio de cultivo y es precisamente durante ese tiempo que se ven forzadas a realizar mayor actividad fotosintética, en comparación con las plantas cultivadas en el SIC, las cuales permanecieron en contacto continuo con el medio de cultivo y en consecuencia con las fuentes de carbono.

Según Kozai *et al.* (2005) las condiciones de cultivo para el desarrollo del crecimiento fotomixotrófico pueden inducir síntesis de clorofilas en las hojas de las plantas *in vitro*. Lo cual puede explicar porque en las hojas de las plantas de ñame cultivadas en el SIT al final de la etapa de crecimiento existió mayor contenido de los pigmentos fotosintéticos en comparación con las cultivadas en el resto de los sistemas de cultivo.

Aragón (2005) analizó el contenido de clorofila (*a*, *b* y totales), y su relación con la fotosíntesis durante la fase de enraizamiento de plantas de plátano cultivar 'CEMSA ¾' cultivadas en el SIT bajo condiciones de fotomixotrofismo, alta iluminación ($250 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) y alta concentración de CO_2 ($1200 \mu\text{mol.mol}^{-1}$). Ellos determinaron que las plantas que contenían más clorofilas *a* ($63,54 \mu\text{g.g MF}^{-1}$), *b* ($35,67 \mu\text{g.g MF}^{-1}$) y totales ($99,21 \mu\text{g.g MF}^{-1}$) fueron las que a su vez mostraron los mayores valores de fotosíntesis neta ($2,41 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y menor transpiración total ($1,53 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

Por su parte Chakrabarty *et al.* (2006) en el cultivo de brotes del manzano (*Malus domestica* Borkh.) compararon en biorreactores de inmersión continua, en el cual el volumen de entrada de aire fue ajustado a $0,1 \text{ mL.min}^{-1}$ y en biorreactores tipo inmersión temporal programado para realizar cuatro inmersiones del medio de cultivo a los brotes con un tiempo de inmersión de 15 minutos cada día obtuvieron en los brotes cultivados en los biorreactores tipo inmersión temporal mayor contenido de clorofilas *a* y *b*, fluorescencia de la clorofila y fotosíntesis neta en comparación con los brotes que se cultivaron en el biorreactores de inmersión continua. Estos brotes a su vez presentaron mayor masa fresca, seca, longitud y menor hiperhidricidad.

Escalona *et al.* (2007), explicaron que en los SIT la renovación periódica de la atmósfera interna del frasco de cultivo y el contacto intermitente de las plantas con el medio de cultivo, logra que las plantas cultivadas en estos sistemas de cultivo mejoren la relación entre la fotosíntesis y la transpiración. Estas condiciones de cultivo propiciaron que las plantas de ñame cultivadas en los SIT presentaran mejor funcionalidad estomática y relación en cuanto al movimiento de gases con la entrada de CO_2 y la salida de agua, reflejado en una mejor relación entre la fotosíntesis y la transpiración en comparación con las plantas cultivadas en el resto de los sistemas de cultivo.

Los menores valores de conductancia que se registraron en las hojas de las plantas cultivadas en el SIT en comparación con los registrados en las hojas de las plantas cultivadas en el SIC y en el SLE, nos indican según Afreen (2005) que estas presentaron mejor integralidad en el desarrollo estructural de las hojas. Esto sugirió que el mesófilo tuviera tejidos del parénquima de empalizada y lagunoso más definido, mayor dimensión en los espacios intercelulares, mayor contenido de cloroplastos, mejor desarrollo de células epidérmicas y presencia de ceras epicuticulares. Además, sus estomas fueron mucho más funcionales, pues estos debieron haber permitido que entrara suficiente CO₂, mientras conservaron lo más posible el agua. El mayor desarrollo morfológico en las hojas de las plantas cultivadas en el SIT, las convirtió en más funcionales desde el punto de vista fisiológico, lo cual se reflejó en una mejor relación entre la fotosíntesis neta y la transpiración total.

Fue también en el SIT, el tratamiento en el que se observó un mayor contenido de almidón en las hojas de las plantas de ñame. Como se conoce el almidón acumulado en las hojas de las plantas *in vitro* puede provenir de precursores debido a la hidrólisis de la sacarosa del medio de cultivo (Kozai *et al.*, 2005) y de los esqueletos carbonados formados a través de la fotosíntesis que pueden aportar hexosas que se transforman en almidón (Mendrano y Flexas, 2001). En este caso, la mayor actividad fotosintética y la mejor funcionalidad de los mecanismos para evitar las pérdidas innecesarias de agua en las plantas de ñame cultivadas en el SIT favorecieron la mayor acumulación de este compuesto respecto a los restantes tratamientos. Investigadores como Aragón *et al.* (2009), en el cultivo del plátano CEMSA ¾ determinaron que en los SIT las condiciones de crecimiento fotomixotrófico estimularon la acumulación de carbohidratos en forma de almidón.

Las condiciones de cultivo que se crearon en el SIT permitieron el mejor crecimiento de las plantas de ñame. Según Berthouly y Etienne (2005) y Escalona (2006), en los SIT se

conjugan factores que permiten un contacto intermitente del medio de cultivo con el material vegetal, lo cual posibilita un aporte eficiente de elementos nutritivos y una renovación periódica de la atmósfera interna del frasco de cultivo. Ellos han logrado con el empleo del SIT incrementar el crecimiento de las plantas y la proliferación de los brotes en cultivos como *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* L., piña (*Ananas comosus* L.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), *Eucalyptus grandis* L., *Anthurium andraeanum* Schott y en otras especies de *Araceae* en comparación con los protocolos desarrollados para estos cultivos en medios de cultivo en estado semisólido y líquido estático.

Todo lo anterior permitió relacionar porqué las plantas de ñame cultivadas en el SIT que presentaron mayor contenido de clorofilas (*a*, *b* y totales), actividad fotosintética, menor transpiración y conductancia estomática, así como una mejor relación entre la fotosíntesis/transpiración mostraron una mejor respuesta al evaluar indicadores morfológicos como longitud total de la planta, número de yemas axilares, masa fresca y seca por planta.

4.1.2. Evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos en la etapa de formación de microtubérculos

En los tres sistemas de cultivo las plantas iniciaron el proceso de formación de los microtubérculos en la segunda semana de cultivo con la elongación de la yema axilar; precedida por un engrosamiento y alargamiento en la base de dicha yema, de la cual resultó la formación de una protuberancia de color blanquecino en la axila de la hoja, de esta protuberancia surgieron algunas raíces. A las seis semanas de cultivo se observó la formación de una estructura similar a un microtubérculo joven con forma esférica (Figura 6), el cual en el extremo distal a su unión con la planta *in vitro* presentó una zona de color blanco. Luego continuó el desarrollo de los microtubérculos hasta las 18 semanas de cultivo, en la cual se realizó su cosecha.



Figura 6. Frasco de cultivo del sistema de inmersión temporal con microtubérculos de ñame clon ‘Pacala Duclos’ a las seis semanas de cultivo.

El tipo de sistema de cultivo también influyó de forma significativa en la etapa de formación de los microtubérculos. Con el empleo del SIT se formaron los microtubérculos de mayor calidad reflejado en los mejores resultados para la masa fresca, seca y diámetro promedio de ellos. Estos indicadores morfológicos presentaron diferencias significativas con respecto a los observados en microtubérculos que se formaron en el SIC y en el SLE (Tabla 3).

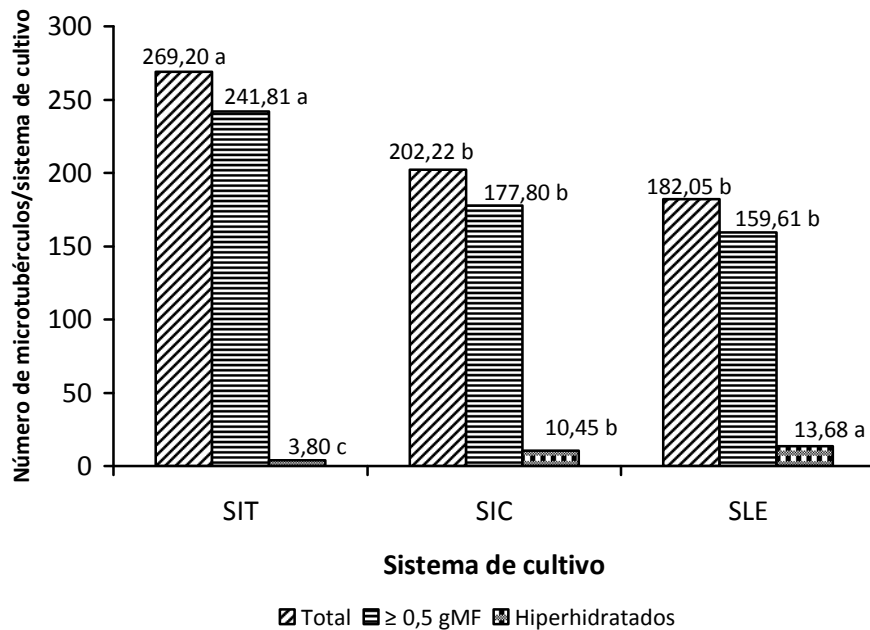
A las 18 semanas de cultivo, se logró en el SIT el mayor número total de microtubérculos (Figura 7) y de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g (Figura 8), así como el menor número de microtubérculos hiperhidratados. En todos los casos, estos resultados en el SIT presentaron diferencias significativas respecto al resto de los sistemas de cultivo. Estos microtubérculos se caracterizaron por una coloración blanca de la piel, con un morado, típico de la coloración de la piel en la cabeza de los tubérculos de ñame del clon ‘Pacala Duclos’ que normalmente se obtienen en campo.

Tabla 3. Efecto del tipo de sistema de cultivo en la etapa de formación de microtubérculos de ñame del clon ‘Pacala Duclos’ a las 18 semanas de cultivo.

Variables/ microtubérculo	SIT		SIC		SLE	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
Masa fresca (g)	1,98	73,57 a	1,45	40,50 b	1,18	22,43 c
Masa seca (g)	0,18	75,50 a	0,10	39,03 b	0,07	21,97 c
Diámetro (mm)	9,10	71,75 a	7,50	37,40 b	6,05	27,35 c

Rangos medios con letras no comunes en una misma fila difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$ (n=120).

Leyenda: SIT: Sistema de inmersión temporal, SIC: Sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo, SLE: Sistema con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna.



Medias con letras no comunes en un mismo tipo de barras difieren según prueba de *Tukey* para $p < 0,05$ (n=4).

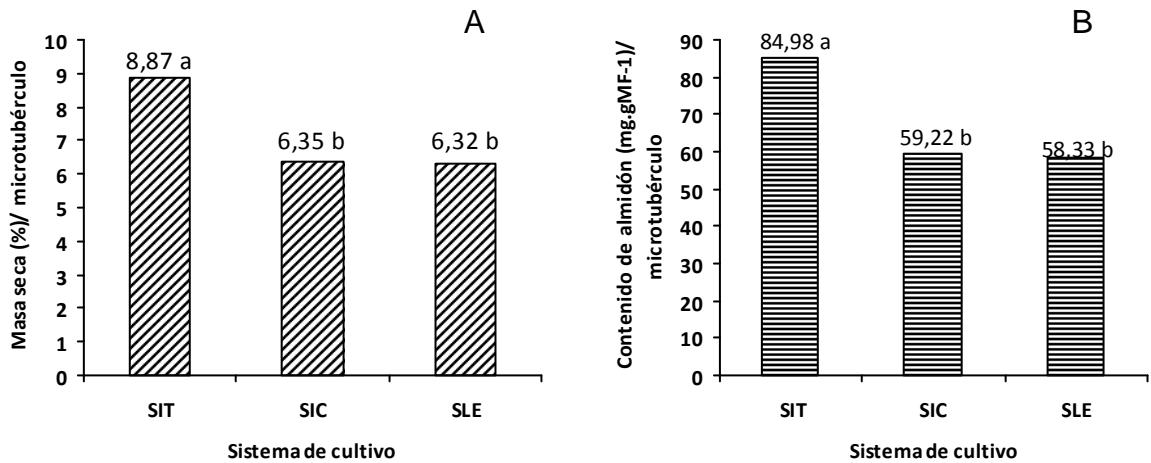
Leyenda: SIT: Sistema de inmersión temporal, SIC: Sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo, SLE: Sistema con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna.

Figura 7. Efecto del sistema de cultivo sobre el tipo de microtubérculos de ñame clon ‘Pacala Duclos’ que se formaron en las 18 semanas de cultivo.



Figura 8. Microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' con una masa fresca igual o superior a 0,5 g cosechados a las 18 semanas de cultivo en el sistema de inmersión temporal.

Los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g que se formaron en el SIT se distinguieron por su calidad, expresada en el mayor porcentaje del contenido de masa seca (figura 9 A) y de almidón (figura 9 B), en comparación con los que se formaron en el SIC y en el SLE. Se debe señalar la importancia de los valores de contenido de la masa seca como un indicador de calidad de los microtubérculos. La masa seca de los microtubérculos 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 y calcio, lo que le permiten, según Gopal *et al.* (2008) a los microtubérculos de papa conjuntamente con la mayor acumulación de sustancias de reservas en forma de almidón, mejores posibilidades de conservación durante el almacenamiento y posterior brotación.



A: Medias con letras no comunes en las barras difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$ ($n=100$) y B: Medias con letras no comunes en las barras difieren según prueba de *Tukey* para $p < 0,05$ ($n=24$).

Leyenda: SIT: Sistema de inmersión temporal, SIC: Sistema de inmersión constante con aeración mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo, SLE: Sistema con el medio de cultivo líquido estático con renovación pasiva de la atmósfera interna.

Figura 9. Efecto del tipo de sistema de cultivo en el contenido de masa seca (A) y de almidón (B) de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g de ñame clon ‘Pacala Duclos’ a las 18 semanas de cultivo.

Pérez *et al.* (2001) y Jiménez (2005) en el cultivo de la papa han logrado con el empleo del SIT mayor formación de microtubérculos en comparación con otros diseños de sistema de cultivo semi-automatizados. Según estos investigadores, el contacto intermitente entre el material vegetal y el medio de cultivo, y la renovación periódica de la atmósfera interna del frasco de cultivo que ocurre en el SIT, estimuló la formación y desarrollo de los microtubérculos en este cultivo. Al respecto ha sido señalado por Roels *et al.* (2006) que en este tipo de sistema de cultivo es posible luego de finalizada cada inmersión lograr una concentración de dióxido de carbono (CO_2) y oxígeno (O_2) cercana a la concentración atmosférica y eliminar la acumulación de etileno del espacio gaseoso del frasco de cultivo. Estas condiciones de cultivo que se crean en el SIT permitieron la mayor formación de los

microtubérculos de ñame en comparación con los obtenidos en el resto de los sistemas de cultivo.

Resultados similares han sido descritos con el empleo del SIT, pero para la formación de microtubérculos de papa por investigadores como Teisson y Alvard (1999), ellos dependiendo de la variedad de papa (Bintje, Ostara y Desiré), obtuvieron de 47 a 115 microtubérculos por frasco de cultivo tipo RITA®. Resultados estos, que superaron en ese momento a los descritos con anterioridad en la literatura científica. Piao *et al.* (2003) describieron un protocolo simple para la producción de microtubérculos de papa en biorreactor de inmersión temporal y revelaron que la formación de los microtubérculos fue mucho más eficientes con la inmersión temporal que con la inmersión constante en medio de cultivo líquido sin ventilación, en el cual las plantas crecieron pobremente, debido posiblemente, según estos investigadores a la carencia de oxígeno y a la acumulación de etileno.

Por su parte, Zobayed (2005) realizó la propagación y tuberización *in vitro* de la papa en sistemas de cultivo cerrado sin renovación de la atmósfera interna, en sistema de cultivo con una ventilación difusa y en un sistema de cultivo con ventilación forzada. Este investigador demostró también que la composición de los gases que conforman la atmósfera interna del frasco de cultivo influyó en la tuberización *in vitro* de la papa. En su investigación obtuvo, con el sistema de cultivo con ventilación forzada, el mayor número de microtubérculos por frasco de cultivo y logró producir microtubérculos con el doble de la masa fresca y seca en comparación con los obtenidos en el sistema de cultivo de ventilación difusa, debido a que en este tipo de sistema de cultivo con ventilación forzada fue posible mantener una concentración de O₂ alrededor del 20,0% y CO₂ alrededor del 3,0%, concentraciones cercanas a la atmosférica y a su vez se produjo la eliminación de la acumulación de etileno en el interior de la atmósfera del frasco de cultivo. Este investigador también corroboró lo

descrito por Claassens y Vreugdenhil (2000), y Donnelly *et al.* (2003) en cuanto a que la acumulación de etileno en el interior de la atmósfera interna del frasco de cultivo, inhibe la tuberización *in vitro* e induce crecimiento estolonífero en los brotes, y reduce la masa fresca de los microtubérculos en el cultivo de la papa.

Basado en la evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos en las etapas de crecimiento de las plantas y formación de microtubérculos se definió como el mejor sistema de cultivo el de inmersión temporal para la tuberización *in vitro* de ñame clon 'Pacala Duclos'.

4.1.3. Determinación de azúcares reductores y nutrientes minerales en el medio de cultivo del sistema de inmersión temporal

En la etapa de crecimiento de las plantas, se determinó que a las seis semanas de cultivo los azúcares reductores se habían agotado completamente en el medio de cultivo. Este resultado abre las interrogantes sobre si este compuesto se convirtió en limitante para el desarrollo de las plantas o si influyó en alguna medida sobre la actividad fotosintética que se registró. Según Kozai *et al.* (2005), las plantas que toman para el crecimiento, tanto los carbohidratos exógenos del medio de cultivo, como los carbohidratos producidos endógenos por la fotosíntesis, presentan una nutrición fotomixotrófica, proceso que pudo haber ocurrido en el caso de las plantas de ñame cultivadas en el SIT. Resultados similares en cuanto al metabolismo fotomixotrófico han sido descritos en este tipo de sistema de cultivo en cultivos como la piña por Escalona *et al.* (2003), pues aunque los brotes se desarrollaron con alta intensidad luminosa ($225 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) y realizaron fotosíntesis el crecimiento de las plantas *in vitro* dependió más de los azúcares y nutrientes minerales del medio de cultivo que de la fotosíntesis. Sin embargo, Aragón (2005) señaló que las plantas de plátano *in vitro* que se cultivaron en biorreactores de inmersión temporal experimentaron un crecimiento fotomixotrófico, pues aunque no agotaron todo el azúcar del medio de cultivo presentaron

alta fotosíntesis neta ($13,60 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) bajo condiciones de cultivo de alta luz y alta concentración de CO_2 .

A diferencia de la etapa de crecimiento de las plantas, la cual se desarrolló a la luz y las plantas presentaron un crecimiento fotomixotrófico, en la etapa de formación de microtubérculos, la cual se desarrolló a la oscuridad, las plantas presentaron una nutrición heterotrófica causa por la cual se necesitó altas concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo. Al final de esta etapa de cultivo (18 semanas) los azúcares reductores se habían agotado completamente en el medio de cultivo. Claassens y Vreugdenhil (2000) señalaron que la formación de tubérculos *in vitro* ocurre con altos niveles de azúcares en el medio de cultivo y Sarkar (2008) describió, como resultados de experimentos de genética molecular, que los azúcares inducen la expresión de una amplia variedad de genes y la síntesis de proteínas específicas de la tuberización. La sacarosa tiene un doble rol en el desarrollo de los microtubérculos. Además de constituir una fuente de carbono fácilmente asimilable por la planta *in vitro* para la conversión en almidón, es la más efectiva fuente de carbono en el desarrollo de los microtubérculos. Al mismo tiempo la sacarosa en concentraciones de 80 a 100 g.L^{-1} proporciona una favorable osmolaridad para el desarrollo de los microtubérculos (Yu *et al.*, 2000).

Uno de los principales cambios bioquímicos que ocurren durante la tuberización *in vitro* es la acumulación de almidón. Este es sintetizado en los amiloplasto de las células del parénquima. El primer paso en la síntesis del almidón ocurre por la acción de la enzima sacarosa sintasa, la reacción catalizada por esta enzima es reversible y ocurre bajo una estricta regulación metabólica. Esta enzima hidroliza la sacarosa en glucosa -1- fosfato y fructosa. Luego ocurre la conversión de la glucosa -1- fosfato catalizada por la enzima ADP glucosa pirofosforilasa en ADP glucosa, que no es más que el sustrato para la síntesis del almidón (Claassens y Vreugdenhil, 2000). Sin embargo, estos investigadores señalaron

también que la sacarosa es rápidamente hidrolizada en glucosa y fructuosa por las enzimas invertasas que existen en diferentes formas, esta rápida degradación afecta severamente el crecimiento subsecuente de los microtubérculos. Por lo que es necesario, según Yu *et al.* (2000), un suministro constante de sacarosa para lograr mantener un óptimo crecimiento en los microtubérculos.

Al finalizar la etapa de crecimiento de las plantas, los nutrientes minerales con menor contenido en el medio de cultivo respecto al valor inicial fueron: fósforo, nitrógeno, magnesio, calcio, hierro y manganeso, mientras que nutrientes minerales como el potasio, cobre y zinc permanecieron por encima del 50% del contenido inicial. Sin embargo, en la etapa de formación de microtubérculos se obtuvo que en el medio de cultivo a las 18 semanas de cultivo, nutrientes minerales como el fósforo se encontraba completamente agotado, el nitrógeno estaba al 8,8%, el calcio al 18,6% y el potasio al 28 % del contenido inicial en el medio de cultivo, mientras que los nutrientes minerales, magnesio, manganeso, zinc, cobre y hierro permanecieron por encima del 50% del contenido inicial (Tabla 4).

Es posible relacionar los diferentes procesos metabólicos y funciones en las células de las plantas, en las cuales se encuentran involucrados los nutrientes minerales de menor contenido en el medio de cultivo con el crecimiento que experimentaron las plantas que se cultivaron en el SIT. Así como los de menor contenido en el medio de cultivo en la etapa de formación de microtubérculos con la activación de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos de la tuberización *in vitro*.

Tabla 4. Contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo al inicio y al finalizar la etapa de crecimiento de las plantas (seis semanas de cultivo) y en la de formación de microtubérculos (18 semanas de cultivo) de ñame clon ‘Pacala Duclos’ en el sistema de inmersión temporal.

Nutriente mineral	Etapa de crecimiento de las plantas			Etapa de formación de microtubérculos		
	Inicial (mg. L ⁻¹)	Final (mg. L ⁻¹)	%	Inicial (mg. L ⁻¹)	Final (mg. L ⁻¹)	%
Nitrógeno	1700	270	15,88	1700	150	8,82
Fósforo	85	5,50	6,47	85	0	0
Potasio	845	555	65,68	845	245	28,99
Calcio	88,20	22,40	25,39	88,20	16,40	18,59
Magnesio	34,60	6,30	18,20	34,60	20,36	58,80
Manganeso	4,35	2,12	48,73	4,35	3,02	69,42
Zinc	1,60	1,02	63,75	1,60	0,92	57,50
Cobre	0,02	0,012	60,00	0,02	0,011	55,00
Hierro	4,56	1,22	26,75	4,56	2,34	51,31

Leyenda: % Porcentaje respecto al contenido inicial

Al final de ambas etapas de cultivo nutrientes minerales como el fósforo, nitrógeno y calcio resultaron los de menor contenido respecto al valor inicial. Sin embargo, en la etapa de crecimiento de las plantas que se desarrolló a la luz y las plantas experimentaron actividad fotosintética el magnesio y manganeso disminuyeron en el medio de cultivo. Mientras que en la etapa de formación de microtubérculos que se desarrolló a la oscuridad y la finalidad era la acumulación de sustancias de reservas fundamentalmente en forma de almidón, el fósforo se agotó y se registró un menor contenido de potasio en el medio de cultivo.

George y Klerk (2008) explicaron la participación del fósforo en la formación de los ácidos nucleicos y en todas aquellas reacciones de oxidación-reducción donde ocurren

transferencias de hidrógeno, pues el fósforo participa en el metabolismo energético y la biosíntesis de las células, debido a que forma parte de la glucosa-6-fosfato y adenosintrifosfato (ATP), además, participa en la estabilidad de las membranas, tiene efecto regulatorio en muchos procesos metabólicos de la planta, y ha sido descrito como un elemento importante en la regulación de la síntesis de almidón, pues constituye un activador de la enzima adenosin difosfato carboxilasa gluco-pirofosforilasa, la más importante enzima involucrada en la síntesis del almidón. Este elemento también interviene en procesos metabólicos vitales como la fotosíntesis y la respiración así como, en la regeneración de la ribulosa bifosfato, enzima importante en la fijación del carbono. El nitrógeno participa en las síntesis de moléculas orgánicas complejas, como aminoácidos, proteínas, y la porfirina, molécula que se halla en compuestos tan importantes, desde el punto de vista metabólico, como las clorofilas y en las enzimas del grupo de los citocromos, esenciales para la fotosíntesis y la respiración. Ellos se han referido además, a que el calcio interviene en la estructura y propiedades fisiológicas de las membranas celulares y en la lámina media de la pared celular, así como que el potasio interviene en la síntesis y metabolismo de carbohidratos complejos como el almidón, pues tiene efecto regulatorio de varias enzimas involucradas en el metabolismo del carbono. También han señalado la participación del magnesio en las moléculas de clorofila de los sistemas de pigmento I y II de la fotosíntesis. Aunque los nutrientes minerales Mn, Zn, Cu y Fe mostraron menor variación respecto a la concentración inicial en el medio de cultivo, también ha sido señalada por Chajer *et al.* (2008), su participación como activadores y cofactores regulatorios de varias enzimas, las cuales pudieron haber intervenido en el crecimiento de las plantas, así como en la formación y desarrollo de los microtubérculos de ñame.

Los resultados del presente trabajo constituyen el primer informe sobre la formación de microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' en sistema de cultivo semi-automatizados de

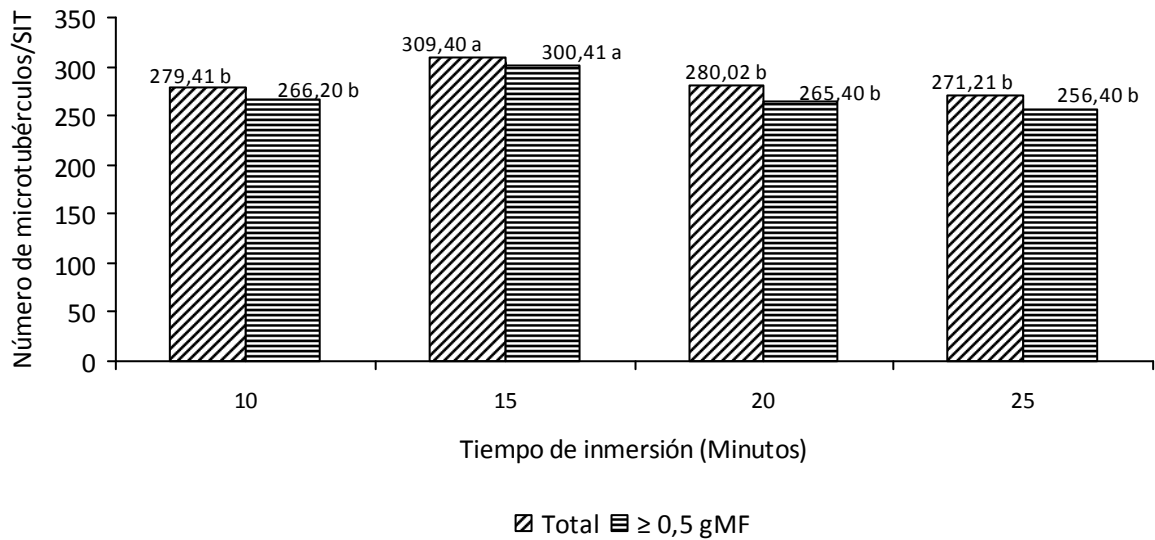
inmersión temporal con el empleo de frascos de cultivo tipo *Clearboys* de 10,0 L de volumen que permitieron cultivar 100 plantas por frasco. Estos resultados superan a los logrados por Salazar y Hoyos (2007) en cuanto al número de microtubérculos por planta (2,69 – 0,85), el cual se calculó al dividir el número total de microtubérculos que se formaron entre el número de plantas por frasco de cultivo, y a la masa fresca promedio por microtubérculo, aunque estos investigadores emplearon un clon de ñame diferente ('Pico de Botellas') y frascos con menor volumen de cultivo (tipo RITA®).

Aunque en la tuberización *in vitro* de ñame clon 'Pacala Duclos' en SIT se formó un 89,8% de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g y estos microtubérculos se caracterizaron por su alto contenido de masa seca y almidón, es necesario investigar si la variación de las condiciones de cultivo en los SIT permite incrementar el número y la masa fresca de los microtubérculos lo que redundará en mayor calidad.

4.2. Efecto de las condiciones de cultivo en el sistema de inmersión temporal sobre la formación de microtubérculos

4.2.1. Efecto del tiempo de inmersión

El tiempo de inmersión influyó sobre el número y la masa fresca de los microtubérculos que se formaron por SIT. Los mejores resultados se alcanzaron con un tiempo de inmersión de 15 minutos. Con este tiempo de inmersión se obtuvo a las 18 semanas de cultivo el mayor número total de microtubérculos por SIT (309,40) y el mayor número de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g (300,41), con diferencias significativas respecto al resto de los tiempos de inmersión (Figura 10).

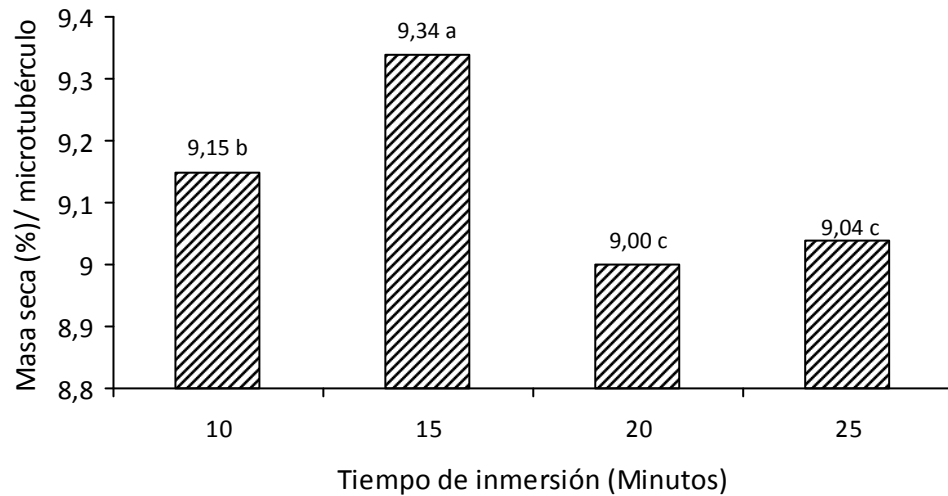


Medias con letras no comunes en un mismo tipo de barras difieren según prueba de *Tukey* para $p < 0,05$ ($n=5$).

Figura 10. Efecto del tiempo de inmersión sobre el número de microtubérculos total y el número de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g de ñame clon ‘Pacala Duclos’ obtenidos por sistema de inmersión temporal a las 18 semanas de cultivo.

Los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g que se formaron en el SIT con tiempo de inmersión de 15 minutos presentaron además, el mayor porcentaje del contenido de masa seca (9,34%) con diferencias estadísticas significativas en comparación con los que se formaron en el resto de los tratamientos (Figura 11).

En cuanto al tiempo de contacto del material vegetal con el medio de cultivo, con un tiempo de inmersión de 15 minutos las plantas *in vitro* tuvieron mayor posibilidad de asimilar los nutrientes del medio de cultivo, en comparación con un tiempo de inmersión de 10 minutos. Este mayor tiempo de contacto de las plantas *in vitro* con el medio de cultivo propició la mayor acumulación de sustancias de reservas en los microtubérculos, reflejado en los mayores valores en cuanto al porcentaje de masa seca al comparar ambos tratamientos.



Medias con letras no comunes en las barras difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$ ($n=100$)

Figura 11. Efecto del tiempo de inmersión sobre el porcentaje del contenido de masa seca de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 gMF de ñame clon 'Pacala Duclos' a las 18 semanas de cultivo.

Sin embargo, investigadores como Martre *et al.* (2001) han descrito que prolongados períodos de inmersión afectan el desarrollo del material vegetal a causa de un incremento de la hiperhidricidad y estrés oxidativo. En sus investigaciones consideraron que un tiempo de contacto del material vegetal con el medio de cultivo de apenas un minuto por encima del tiempo de inmersión con el cual habían logrado la mayor tasa de crecimiento relativo de *Hevea brasiliensis*, fue suficiente como para que se observara apariencia acuosa en el material vegetal y como para causar una alta actividad de la superoxidasa dismutasa y de la peroxidación de los lípidos de las membranas provocando daños celulares en el material vegetal. Roels *et al.* (2005) cuando incrementaron el tiempo de inmersión de 12 minutos, tiempo en el cual se lograron lo mejores resultados en la multiplicación y características morfológicas de los brotes de plátano, a 22 minutos de inmersión observaron que los brotes presentaron hiperhidricidad, inferior longitud y menor número de hojas.

Estos resultados pueden explicar la respuesta de las plantas de ñame cultivadas con tiempos prolongados de inmersión de 20 y 25 minutos, tratamientos en los cuales se formó un menor número de microtubérculos. Estos se caracterizaron por una apariencia acuosa y presentaron un menor porcentaje del contenido de masa seca en comparación con los que se formaron en el tratamiento con 15 minutos de inmersión.

Teisson y Alvard, (1999) en el SIT tipo RITA® con un tiempo de inmersión de 60 minutos obtuvieron para la tuberización *in vitro* de la papa, dependiendo de la variedad, entre un 30 y 60% de microtubérculos con una masa fresca superior a 0,5 g. Mientras que, Pérez (2001) en SIT con frasco de cultivo de 3 500 mL de capacidad con dos minutos de inmersión obtuvo el mayor número de microtubérculos totales por sistema (187) en comparación con 30 minutos de inmersión el cual fue de 136. Según estos investigadores, con esos tiempos de inmersión se logró en cada uno de los tipos de sistemas de cultivo, un ambiente gaseoso favorable para el proceso de tuberización *in vitro*.

Lo anterior demuestra la necesidad de determinar el tiempo de inmersión para cada una de las especies y fases de cultivo en la micropropagación, pues del ajuste del tiempo de inmersión depende en gran medida la eficiencia del empleo de los SIT (Berthouly y Etienne, 2005; Escalona, 2006).

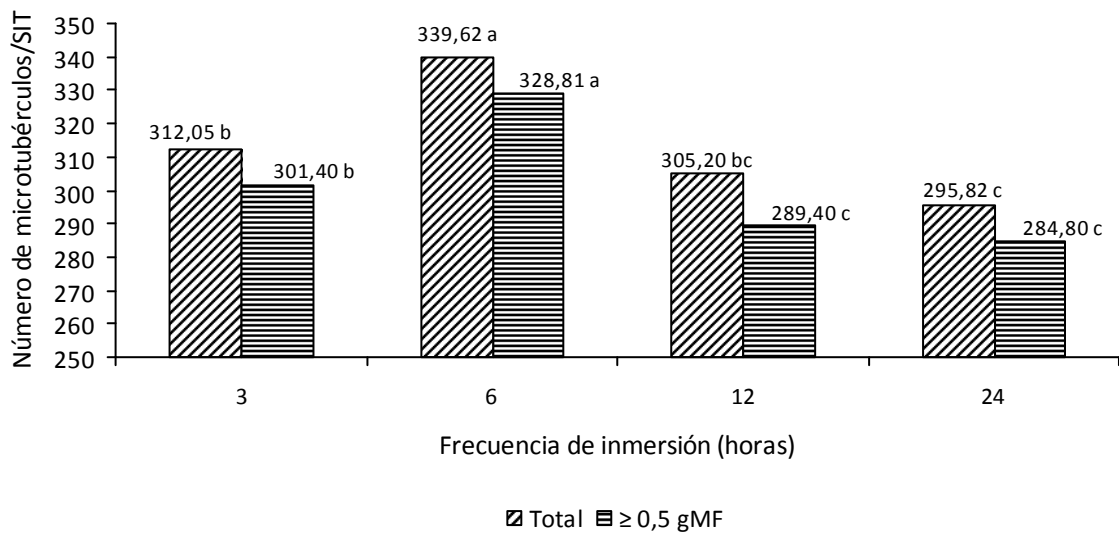
A partir de los resultados de este estudio, para el caso del clon 'Pacala Duclos' al desarrollar la etapa de formación de microtubérculos en SIT, se decidió continuar con un tiempo de inmersión 15 minutos.

4.2.2. Efecto de la frecuencia de inmersión

La frecuencia de inmersión influyó sobre el número y la masa fresca de los microtubérculos que se formaron por SIT. Los mejores resultados se alcanzaron con una inmersión cada seis horas. Con esa frecuencia de inmersión se obtuvo a las 18 semanas de cultivo el mayor número total de microtubérculos por SIT (339,62) y el mayor número de microtubérculos con

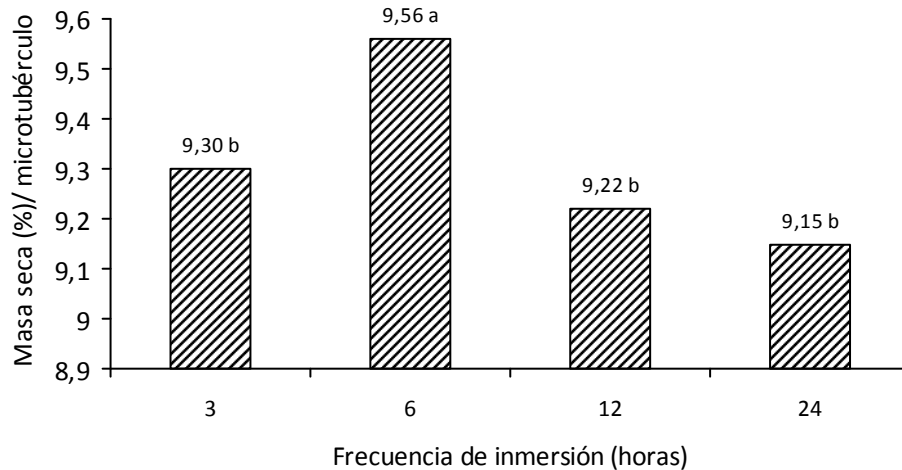
una masa fresca igual o superior a 0,5 g por SIT (328,81) con diferencias significativas respecto al control y al resto de los tiempos de inmersión (Figura 12). Los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g que se formaron con una frecuencia de inmersión cada seis horas presentaron además, el mayor porcentaje del contenido de masa seca (9,56%) con diferencias estadísticas significativas en comparación con los restantes tratamientos (Figura 13).

Ha sido descrito por McAlister *et al.* (2005) que la frecuencia de inmersión influye en la renovación de la atmósfera interna del frasco de cultivo, así como determina las veces en que el material vegetal está en contacto con el medio de cultivo. Por ello se hace necesario determinar la frecuencia de inmersión según la fase de cultivo para satisfacer aspectos relacionados con la nutrición mineral del material vegetal (Escalona, 2006).



Medias con letras no comunes en un mismo tipo de barras difieren según prueba de Tukey para $p < 0,05$ ($n=5$).

Figura 12. Efecto de la frecuencia de inmersión sobre el número de microtubérculos total y el número de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g de ñame clon ‘Pacala Duclos’ obtenidos por sistema de inmersión temporal a las 18 semanas de cultivo.



Medias con letras no comunes en las barras difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$ ($n=100$)

Figura 13. Efecto de la frecuencia de inmersión sobre el porcentaje del contenido de masa seca de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 gMF de ñame clon ‘Pacala Duclos’ formados a las 18 semanas de cultivo.

Los mejores resultados en la formación de los microtubérculos de ñame con una inmersión cada seis horas en el SIT se relacionaron a que con esta frecuencia se debió haber logrado una renovación de la composición de los gases que conforman la atmósfera interna del frasco de cultivo y una disponibilidad de nutrientes en función de los requerimientos de las plantas cultivadas *in vitro* favorable para la tuberización *in vitro*, en comparación con las frecuencias de inmersión cada tres, doce y veinticuatro horas.

Piao *et al.* (2003), demostraron que el contacto frecuente del medio de cultivo con las plantas de papa provocó un aumento en la formación de microtubérculos hiperhidratados. Al aumentar la frecuencia de inmersión de cuatro (inmersión cada seis horas) a ocho (inmersión cada tres horas) veces al día, y de esa forma hacerse más frecuente el contacto del material vegetal con el medio de cultivo se observó la formación de microtubérculos de ñame de menor calidad caracterizados por una consistencia acuosa. Esto se reflejó en el menor porcentaje del contenido de masa seca en los microtubérculos.

Por el contrario, con las frecuencias de inmersión cada doce y veinticuatro horas, las plantas *in vitro* tuvieron menos posibilidades para asimilar nutrientes y acumular sustancias de reserva en comparación al tratamiento con cuatro inmersiones al día, en el cual los microtubérculos alcanzaron los mayores porcentaje de masa seca.

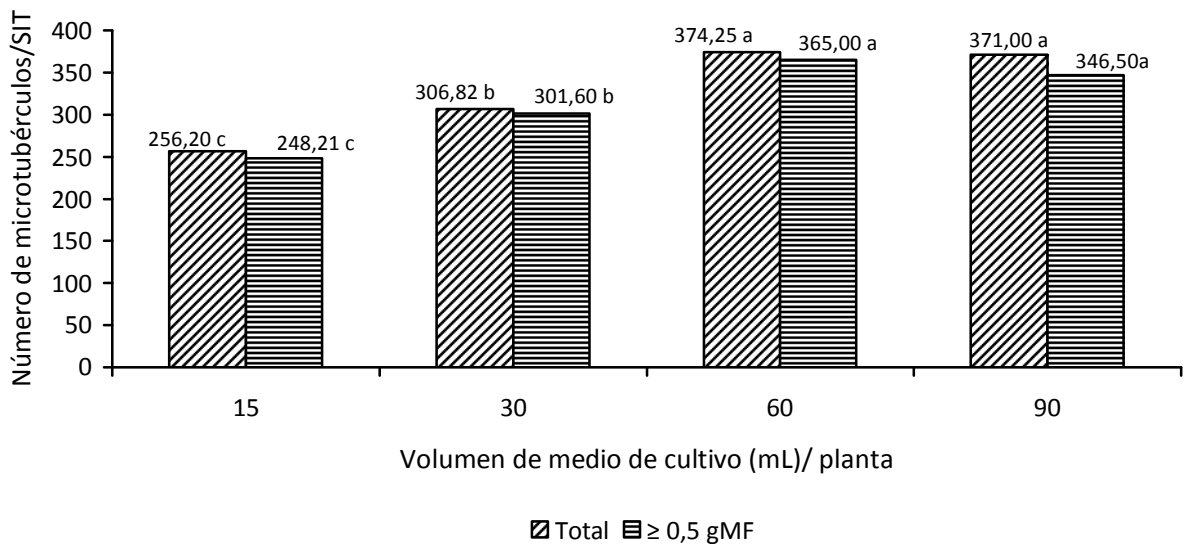
Salazar y Hoyos (2007) emplearon para la tuberización *in vitro* del ñame en sistema de inmersión temporal Tipo RITA®, la misma frecuencia que utilizaron para la fase de multiplicación (una inmersión cada ocho horas), esa pudiera ser una de las explicaciones a los resultados poco satisfactorios que ellos obtuvieron en cuanto al número de microtubérculos que se formaron por sistema (8,5) y masa fresca promedio de los microtubérculos (0,24 g). Por el contrario, Jiménez (2005) para la producción de microtubérculos de papa en SIT a gran escala, utilizó frascos de cultivo tipo *Clearboys* de 10,0 L de volumen, y empleó una inmersión cada tres horas para la etapa de crecimiento de las plantas y cada seis horas para la etapa de formación de los microtubérculos. Con esas diferentes frecuencias de inmersión obtuvo el mayor número total de microtubérculos por frasco de cultivo (312) y un 78,1% de microtubérculos con diámetro superior a 7,0 mm, considerado como el diámetro necesario para obtener una respuesta satisfactoria respecto a la brotación y supervivencia de estos al plantarlos directo a campo. Estos resultados se debieron a las favorables condiciones de cultivo creadas en el interior del frasco de cultivo en cada una de las etapas de cultivo según los requerimientos de las plantas.

Los resultados del presente trabajo para la tuberización *in vitro* del clon 'Pacala Duclos' demuestran la necesidad de determinar la frecuencia de inmersión para cada una de las especies y etapas de la tuberización *in vitro*, pues del ajuste de la combinación del tiempo y frecuencia de inmersión depende en gran medida la eficiencia del empleo de los SIT (Berthouly y Etienne, 2005).

A partir de los resultados del presente experimento se definió emplear una frecuencia de inmersión cada seis horas en la formación de los microtubérculos de ñame clon ‘Pacala Duclos’ en SIT.

4.2.3. Efecto del volumen de medio de cultivo por planta cultivada *in vitro*

En la medida que se incrementó el volumen de medio de cultivo por planta *in vitro* se incrementó el número y la masa fresca de los microtubérculos de ñame. Los mejores resultados se alcanzaron al emplear un volumen de 60 y 90 mL de medio de cultivo por planta *in vitro*. Con estos volúmenes de medio de cultivo por planta se obtuvo a las 18 semanas de cultivo el mayor número total de microtubérculos por SIT (374,2 y 371,0) y el mayor número de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g (365,0 y 346,5) con diferencias significativas respecto al control (30 mL de medio de cultivo por planta) y al tratamiento con 15 mL de medio de cultivo por planta (Figura 14).

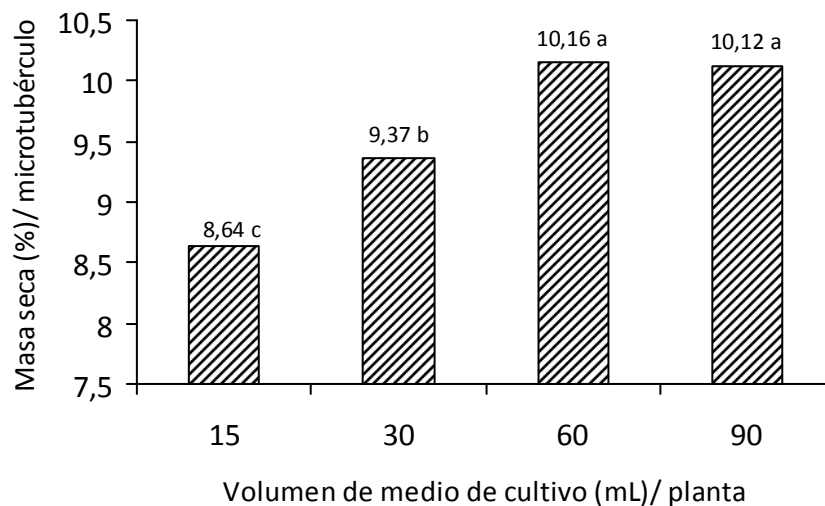


Medias con letras no comunes en un mismo tipo de barras difieren según prueba de *Tukey* para $p < 0,05$ ($n=5$).

Figura 14. Efecto del volumen de medio de cultivo sobre el número de microtubérculos total y el número de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g de ñame clon ‘Pacala Duclos’ obtenidos por sistema de inmersión temporal a las 18 semanas de cultivo.

Los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g que se formaron con volúmenes de 60 y 90 mL de medio de cultivo por planta *in vitro* presentaron además, el mayor porcentaje del contenido de masa seca (10,16 y 10,12%) sin diferencias significativas entre ellos, pero si con diferencias estadísticas significativas en comparación con los restantes tratamientos (Figura 15).

Las plantas *in vitro* en las cuales se indujo la tuberización habían experimentado un etapa crecimiento, estas presentaban una longitud total promedio de 20,80 cm y un número de yemas axilares promedio de 8,60. Con 60 y 90 mL de medio de cultivo por planta (6,0 y 9,0 L de medio de cultivo por frasco de cultivo) existió mayor posibilidad de que un mayor número de yemas axilares recibieran el estímulo inductor del medio de cultivo para la tuberización *in vitro*, lo cual contribuyó a que se formaran mayor número de microtubérculos por SIT.



Medias con letras no comunes en las barras difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$ ($n=100$)

Figura 15. Efecto del volumen de medio de cultivo sobre el porcentaje del contenido de masa seca de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 gMF de ñame clon ‘Pacala Duclos’ formados a las 18 semanas de cultivo.

El efecto del volumen de medio de cultivo está relacionado con la cantidad de nutrientes que el mismo aporta y en dependencia de la especie, y fase de cultivo de la micropropagación (Escalona *et al.*, 2007).

Con estos volúmenes de medio de cultivo también se les propició a las plantas *in vitro* de ñame mayor disponibilidad de nutrientes para la tuberización *in vitro* en comparación con los volúmenes de 15 y 30 mL de medio de cultivo. En el epígrafe 4.1.3 se determinó que en la etapa de formación de microtubérculos en SIT con un volumen de 30 mL de medio de cultivo por planta, los azúcares reductores se habían agotado completamente y que nutrientes minerales como el fósforo también se había agotado y que otros como el nitrógeno, calcio y potasio se encontraban en bajo contenido en el medio de cultivo. La mayor disponibilidad de nutrientes para la tuberización *in vitro* con 60 y 90 mL de medio de cultivo por planta *in vitro* se reflejó en los mayores valores en cuanto al porcentaje del contenido de masa seca que se logró en los microtubérculos que se formaron en el SIT.

Berthouly y Etienne, (2005) señalaron que el volumen de medio de cultivo por planta *in vitro* utilizado en los frascos de cultivo de inmersión temporal es uno de los principales factores a evaluar para utilizar eficientemente este tipo de sistema de cultivo. Lo cual se evidencia en los resultados del presente trabajo para la formación de microtubérculos de ñame en SIT.

En papa, diferentes investigadores también han evaluado en SIT el efecto del volumen de medio de cultivo en la tuberización *in vitro*. Por ejemplo, Piao *et al.* (2003) luego de evaluar cinco diferentes volúmenes de medio de cultivo en frasco de cultivo de 4,0 L de volumen total, obtuvieron con 50 mL de medio de cultivo un incremento en la masa fresca de los microtubérculos respecto a los restantes tratamientos y más de un 55% de microtubérculos con una masa fresca superior a 1,0 gMF. Estos investigadores, cuando emplearon volúmenes de medio de cultivo por planta *in vitro* superiores, observaron la formación de microtubérculos hiperhidratados.

Según Jiménez (2005), el volumen de medio de cultivo necesario por planta *in vitro* puede estar influenciado por el volumen del frasco de cultivo, así como por el tiempo y la frecuencia de inmersión. En sus investigaciones también evaluó diferentes volúmenes de medio de cultivo por planta *in vitro* y definió que con 75,0 mL de medio de cultivo por planta *in vitro* se obtuvieron microtubérculos de papa a gran escala en frasco de cultivo tipo *Clearboys* de 10,0 L de volumen total con una masa fresca promedio de 1,27 g.

A partir de los resultados de este epígrafe como no existieron diferencias significativas entre 60 y 90 mL de medio de cultivo por planta cultivada *in vitro* para la formación de microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' en SIT, se definió emplear en los próximos experimentos un volumen de 60 mL de medio de cultivo por planta cultivada *in vitro*.

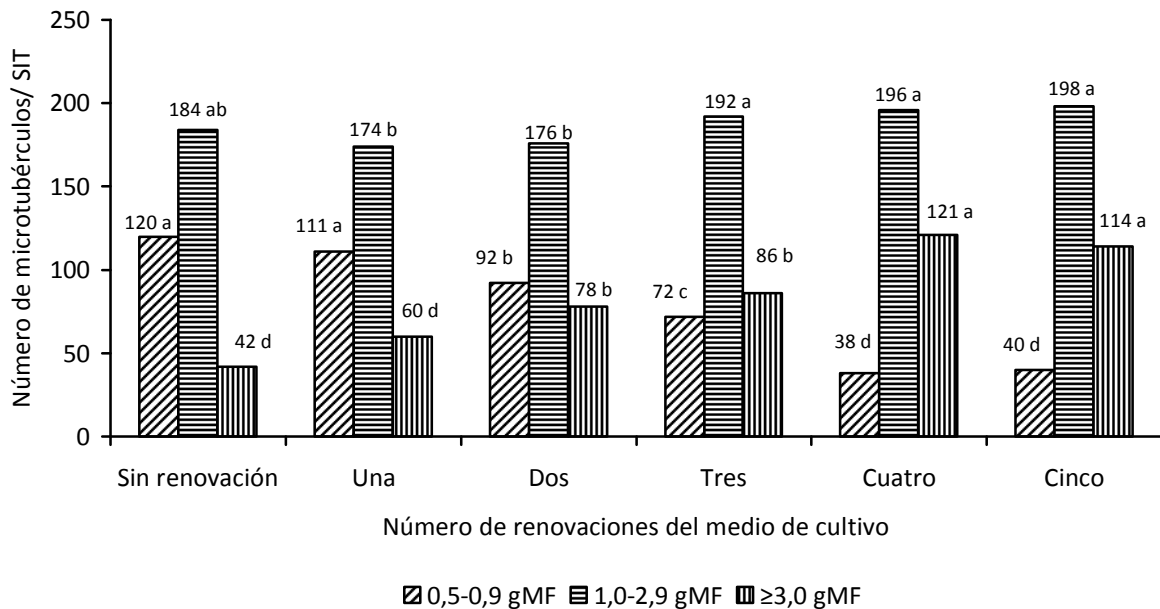
4.2.4. Efecto de las renovaciones del medio de cultivo

La renovación del medio de cultivo no influyó significativamente el número de microtubérculos que se formaron por SIT. Sin embargo, favoreció el incremento de la masa fresca en los microtubérculos, cuando se realizaron cuatro (a las cuatro, ocho, doce y dieciséis semanas de cultivo) y cinco (a las tres, seis, nueve, doce y quince semanas de cultivo) renovaciones de medio se obtuvo al final de la etapa de formación de microtubérculos (18 semanas de cultivo) un menor número de estos con una masa fresca inferior a 1,0 g y se incrementó el número de ellos con una masa fresca superior a 1,0 g. Con cuatro y cinco renovaciones de medio de cultivo se logró que un mayor número de microtubérculos alcanzaran una masa fresca igual o superior a 3,0 gMF, sin diferencias significativas entre ellos, pero sí con respecto al resto de los tratamientos (Figura 16).

Se obtuvieron con cuatro renovaciones de medio de cultivo aproximadamente tres veces más microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 3,0 gMF en comparación con el tratamiento en el cual no se realizó renovación de medio de cultivo. Los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 3,0 gMF se caracterizaron por una mayor resistencia a la

deshidratación y pudieron ser conservados por un periodo de seis meses (datos no mostrados).

Yu *et al.* (2000), determinaron el efecto de la utilización e hidrólisis de la sacarosa sobre la eficiencia en la producción de microtubérculos de papa en biorreactores. Estos investigadores cuando renovaron el 75% del medio de cultivo cada dos semanas de cultivo lograron cuadruplicar el número de microtubérculos que se formaron con una masa fresca superior a 1,0 gMF, en comparación con el tratamiento en el cual no se realizó renovación del medio de cultivo y relacionaron esta respuesta con el efecto positivo de las elevadas concentraciones de sacarosa en la inducción y desarrollo de los microtubérculos, pues además de ser una fuente de carbono que es fácilmente asimilada por la planta *in vitro* y convertida en almidón en el desarrollo de los microtubérculos, la sacarosa también proporciona una favorable osmolaridad (234 mM) en el medio de cultivo para el desarrollo de los microtubérculos. Ellos señalaron además, que mantener un adecuado suministro de sacarosa durante toda la fase de desarrollo de los microtubérculos fue el principal factor para la producción de microtubérculos de mayor masa fresca debido a la rápida hidrólisis de la misma. Los resultados del presente trabajo para la formación de microtubérculos de ñame en SIT concuerdan con lo señalado por estos investigadores en relación a la necesidad de realizar frecuentes renovaciones de medio de cultivo durante la formación de microtubérculos con el objetivo de obtener microtubérculos con mayor masa fresca.



Medias con letras no comunes en un mismo tipo de barras difieren según prueba de Tukey para $p < 0,05$ ($n=4$).

Figura 16. Efecto del número de renovaciones del medio de cultivo en el número de microtubérculos de ñame clon ‘Pacala Duclos’ clasificados según su masa fresca a las 18 semanas de cultivo.

Piao *et al.* (2003) con el objetivo de incrementar la producción de microtubérculos de papa que pudieran ser empleados en los programas de producción de semillas, realizaron estudios sobre el efecto de la renovación del medio de cultivo. Estos investigadores renovaron el medio de cultivo al menos una vez a las seis semanas de cultivo durante la tuberización *in vitro* de la papa en sistemas de inmersión temporal que tuvo un período de duración de 12 semanas de cultivo. Con esa renovación de medio de cultivo obtuvieron 1,63 veces más microtubérculos con una masa fresca superior a 1,0 gMF y 1,32 veces más microtubérculos con una masa fresca superior a 3,0 gMF respecto al tratamiento sin renovación del medio de cultivo.

Ziv (2005) también evaluó para la tuberización *in vitro* de la papa en biorreactores el efecto de la renovación del medio de cultivo. Este investigador reemplazó cada dos semanas de

cultivo el medio de cultivo y logró un rápido crecimiento de los microtubérculos, debido, según sus resultados, a las elevadas concentraciones de sacarosa que son necesarias en el medio de cultivo para el desarrollo de la tuberización *in vitro*.

Las renovaciones de medio de cultivo influyeron en la etapa de formación de microtubérculos de ñame. Cuando se realizaron renovaciones de medio de cultivo y por consiguiente se mantuvo el suministro de altas concentraciones de sacarosa fue posible incrementar la respuesta biológica del material vegetal cultivado en el SIT. Aspecto este, según Berthouly y Etienne (2005), poco tratado hasta ese momento en la literatura, en el cual se debe continuar trabajando.

A partir de los resultados de este epígrafe, se definió para la formación de microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' en el SIT, realizar cuatro renovaciones de medio de cultivo a las cuatro, ocho, doce y dieciséis semanas de cultivo.

La producción de microtubérculos en SIT y su trasplante directo a campo permite eliminar la fase de aclimatización, necesaria en los sistemas de micropropagación convencional, con el consiguiente ahorro de recursos, disminución de los tiempos de cultivo y reducción de los costos del proceso (Jiménez, 2005). Sin embargo, la principal limitante para el trasplante directo a campo es la baja supervivencia y brotación asociada al pequeño tamaño y baja masa fresca de los microtubérculos, lo cual ha sido descrita en ñame (Ijoyah *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Balogun, 2009) y en otras especies como la papa (Özkaynak y Samaci, 2005; Naik y Karihaloo, 2007). En experimentos de campo con microtubérculos de ñame producidos en SIT se demostró que los tubérculos menores de 0,5 g presentaron muy baja supervivencia y brotación, y que los microtubérculos con masa fresca entre 0,5 y 0,9 g la sobrevivencia es de solo un 61,0 % (ver epígrafe 4.3.1). Por esta razón se realizaron los experimentos correspondientes a este acápite que tenían como objetivo incrementar la calidad de los microtubérculos mediante el estudio de las condiciones de cultivo en los SIT.

Al modificar las condiciones de cultivo en los SIT se logró incrementar el número y la masa fresca de los microtubérculos. Tanto el tiempo de inmersión, como la frecuencia de inmersión y el volumen de medio de cultivo por planta *in vitro* influyeron en la formación de los microtubérculos en SIT. Se definió incrementar el tiempo de inmersión de 10 a 15 minutos de inmersión, espaciar la inmersión de tres a seis horas y duplicar el volumen de medio de cultivo por planta *in vitro* (60 mL). Con estas condiciones de cultivo se incrementó en un 28% el número total de microtubérculos que se formaron por SIT (1,4 veces más) y un 33,8% de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g (1,5 veces más). Además, la renovación del medio de cultivo permitió incrementar el número de microtubérculos con una masa fresca igual o mayor a 3,0 g, fue posible obtener del número total de microtubérculos que se formaron por SIT, un 34,0% con una masa fresca igual o superior a 3,0 g, un 55,2% con una masa fresca entre 1,0 a 2,9 g y solo un 10,7% con una masa fresca entre 0,5 a 0,9 g. Estos resultados incrementaron la posibilidad del trasplante directo de estos a campo.

4.3. Evaluación de la respuesta morfoagronómica de las plantas obtenidas de los microtubérculos que se produjeron en SIT y de su primera multiplicación en campo

4.3.1. Influencia de la masa fresca de los microtubérculos sobre su brotación, y sobre la supervivencia y caracteres morfoagronómicos de las plantas derivadas de estos

La masa fresca de los microtubérculos influyó en la brotación de estos en condiciones de campo. Cuando se plantaron directo a campo microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 3,0 g se obtuvo, entre los microtubérculos, el más alto porcentaje de brotación (91,30%) sin diferencias significativas con las coronas de tubérculos (96,50%). Pero si con diferencias significativas respecto a los microtubérculos con masa fresca de 1,0 – 2,9 g y con los microtubérculos con masa fresca entre 0,5 – 0,9 g, en los cuales se obtuvo el más bajo porcentaje de brotación (Tabla 5).

Tabla 5. Influencia de la masa fresca de los microtubérculos de ñame clon ‘Pacala Duclos’ formados en el SIT sobre el porcentaje de brotación a las cuatro semanas de plantados en campo.

Tipo de material vegetal de plantación	Brotación (%)	
	Media	Rangos medios
Microtubérculos (0,5 – 0,9 gMF)	41,50	3,00 c
Microtubérculos (1,0 – 2,9 gMF)	77,50	8,00 b
Microtubérculos ($\geq 3,0$ gMF)	91,30	13,00 a
Coronas de tubérculos (Control)	96,50	14,12 a

Rangos medios con letras no comunes difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$ ($n=200$).

En la literatura científica revisada no fue posible encontrar trabajos publicados donde se hayan efectuado plantaciones directas de microtubérculos de ñame a condiciones de campo sin previa etapa de aclimatización. Debido, entre otras causas, a que la mayoría de los protocolos descritos hasta el presente para la formación de microtubérculos de ñame han producido pequeños microtubérculos con una masa fresca promedio inferior a 0,5 g (Balogun, 2009).

Pérez (2001), en el cultivo de la papa, evaluó la respuesta en campo de microtubérculos de la variedad ‘Atlantic’ que se obtuvieron en los SIT. Este investigador plantó directo en campo microtubérculos con una masa fresca de 1,26 g y un diámetro promedio de 11,4 mm sin previa etapa de aclimatización. En la investigación obtuvo porcentaje de brotación de 89,0% a los 15 días de plantados en campo. Los resultados del presente trabajo en cuanto a la evaluación de la brotación de los microtubérculos de ñame se corresponden con los obtenidos por este investigador en el cultivo de la papa.

Según Pruski *et al.* (2003), los microtubérculos de mayor tamaño y masa fresca de papa que se produjeron en los sistemas de cultivo automatizados, resultaron los más deseados para la producción comercial, ellos pudieron ser plantados en campo sin previa etapa de

aclimatización y conservados durante un período de seis meses, sin que se afectara la brotación.

Por otra parte Naik y Karihaloo (2007) señalaron que el tamaño, masa fresca y la edad fisiológica de los microtubérculos de papa destinados para la plantación directa en campo, determinan la ruptura del período de dormancia y brotación. El tamaño y masa fresca de los microtubérculos están determinados en gran medida por el contenido de sustancias de reserva, dentro de las cuales se encuentra el almidón, el cual es movilizado en la brotación para el posterior crecimiento y desarrollo de los brotes (Claassens y Vreugdenhil, 2000; Özkaynak y Samaci, 2005).

Al evaluar la supervivencia de las plantas de ñame a las seis semanas de cultivo en campo, se observó que esta variable también estuvo influenciada por la masa fresca de los microtubérculos, así como por el tipo de material vegetal de plantación que se empleó. Se obtuvieron los mejores porcentajes de supervivencia entre las plantas procedentes de los microtubérculos, con las plantas procedentes de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 3,0 g (96,50%) sin diferencias significativas con las plantas procedentes de las coronas de tubérculos de la propagación convencional (98,00%). Las plantas de estos tipos de materiales de plantación presentaron diferencias significativas respecto a las de microtubérculos que tenían un masa fresca de 1,0 – 2,9 g y a las de las plantas *in vitro* previamente aclimatizadas, los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellas. El más bajo porcentaje de supervivencia se obtuvo con las plantas procedentes de los microtubérculos que tenían una masa fresca de 0,5 – 0,9 g (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto del tipo de material vegetal de plantación de ñame clon ‘Pacala Duclos’ sobre el porcentaje de supervivencia de las plantas a las seis semanas de cultivo en campo.

Tipo de material vegetal de plantación	Supervivencia (%) de las plantas	
	Media	Rangos medios
Microtubérculos (0,5 – 0,9 gMF)	61,00	3,00 c
Microtubérculos (1,0 – 2,9 gMF)	87,00	10,50 b
Microtubérculos (\geq 3,0 gMF)	96,50	19,50 a
Plantas propagadas <i>in vitro</i>	86,50	10,70 b
Corona de tubérculos (Control)	98,00	21,30 a

Rangos medios con letras no comunes difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$ (n=200).

Pérez (2001) obtuvo, en las plantas procedentes de los microtubérculos de papa que se formaron en el SIT, un porcentaje de supervivencia del 77,3% a los 35 días de cultivo en campo, mientras que con las plantas *in vitro* sólo lograron un 57,5% de supervivencia en esa misma etapa. Debido a las características morfofisiológicas de las plantas *in vitro*, las cuales son frágiles y débiles. Los resultados en cuanto a la supervivencia en campo de las plantas procedentes de los microtubérculos y las de las plantas *in vitro* de ñame que se evaluaron se corresponden con los obtenidos por este investigador.

El resultado en cuanto al más alto porcentaje de supervivencia de las plantas procedentes de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 3,0 g, que se emplearon como material vegetal de plantación directo a campo se pudiera deber a que la supervivencia y el posterior crecimiento de los brotes hasta que las plantas comenzaron a realizar fotosíntesis dependen según Ijoyah *et al.* (2006) de la acumulación de las sustancias de reservas del material vegetal de plantación.

Se alcanzaron entre los microtubérculos de ñame clon ‘Pacala Duclos’ que se formaron en SIT, con los de una masa fresca igual o superior a 3,0 g el más alto porcentaje de brotación (91,30%) y supervivencia de las plantas (96,50%) en campo.

Evaluación de caracteres cualitativos

Las plantas de ñame clon 'Pacala Duclos' procedentes de los microtubérculos, independientemente de la masa fresca de estos, no presentaron diferencias en los caracteres morfológicos cualitativos que se evaluaron en campo, en comparación con las plantas procedentes de las plantas *in vitro* y las plantas provenientes de la propagación convencional que se emplearon como controles (Anexo 2).

Hasta el presente no se han desarrollado estudios sobre la estabilidad de caracteres morfológicos de plantas de ñame a partir de los microtubérculos. Según Balogun (2009), evaluaciones de este tipo constituyen aspectos que deben ser investigados si se pretende desarrollar protocolos de formación de microtubérculos que pudieran ser utilizados para la conservación e intercambio de germoplasma, así como para establecer un programa de producción de material vegetal de plantación en este cultivo.

En el cultivo de la papa ha sido descrito que a través de la organogénesis directa, método de regeneración que usa la yemas existentes en las plantas para la formación de los brotes se proporciona mayor estabilidad en los caracteres morfológicos en la producción de microtubérculos semillas (Sarka, 2008). En el cultivo del ñame los microtubérculos se desarrollan del complejo nodal primario que se encuentra en las axilas de las hojas de los segmentos nodales (Balogun, 2005). Este tipo de origen puede haber propiciado que no existieran cambios en los caracteres morfológicos cualitativos de las plantas de ñame a partir de los microtubérculos.

Gopal *et al.* (2008) evaluaron en campo microtubérculos de 22 genotipos de papa en comparación con tubérculos semillas. El trabajo se desarrolló durante dos años, en dos estaciones, primavera y otoño. Estos investigadores concluyeron que es posible establecer criterios de selección en las plantas a partir de los microtubérculos, debido a la estabilidad en cuanto a hábito de crecimiento de los tallos, característica morfológicas de las hojas,

pigmentación de los tallos, vigor de la planta, así como para la forma y el color de los tubérculos en comparación con las plantas que se obtuvieron de los tubérculos semillas utilizados tradicionalmente para la propagación de este cultivo. Este mismo criterio pudiera emplearse en ñame

Evaluación de caracteres cuantitativos

El tipo de material vegetal de plantación influyó en la respuesta de los caracteres cuantitativos de la plantas de ñame clon 'Pacala Duclos' en campo. En relación con el número de tallos por planta se obtuvieron los mejores resultados en las plantas de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 3,0 g (5,90), las plantas propagadas *in vitro* (5,70), las de las coronas de tubérculos procedentes de la propagación convencional (5,60) y las de los microtubérculos con una masa fresca entre 1,0 – 2,9 g (5,40), sin diferencias significativas entre ellas, pero sí respecto a las de los microtubérculos con masa fresca entre 0,5 – 0,9 g.

En cuanto a la longitud de los tallos y a la masa fresca de los tubérculos por planta, se obtuvieron los mejores resultados en las plantas de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 3,0 g (4,10 m y 3,66 kg/planta) y en las plantas de las coronas de tubérculos procedentes de la propagación convencional (3,90 m y 3,58 kg/planta) sin diferencias significativas entre ellas, pero sí respecto al resto de los materiales de plantación.

Respecto al número de tubérculos por planta, se lograron los mejores resultados en las plantas de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 3,0 g (3,80), en las plantas de los microtubérculos con una masa fresca entre 1,0 – 2,9 g (3,40), en las plantas propagadas *in vitro* (3,20) y en las plantas de los microtubérculos con una masa fresca entre 0,5 – 0,9 g (3,20), sin diferencias significativas entre ellos, pero sí respecto a las plantas de las coronas de tubérculos procedentes de la propagación convencional (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación del tipo de material vegetal de plantación de ñame clon ‘Pacala Duclos’ sobre la respuesta de las plantas en los caracteres cuantitativos del follaje a las 24 semanas de cultivo y de los tubérculos a las 36 semanas de cultivo en campo.

Material vegetal de plantación	Número de tallos/ planta		Longitud de los tallos (m)		Número de tubérculos/ planta		Masa fresca de los tubérculos (kg)/planta	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
Microtubérculos (0,5 – 0,9 gMF)	3,60	10,50 b	2,67	10,50 c	3,20	54,50 a	1,48	10,50 d
Microtubérculos (1,0 – 2,9 gMF)	5,40	52,30 a	3,44	35,70 b	3,40	59,70 a	2,88	31,50 c
Microtubérculos ($\geq 3,0$ gMF)	5,90	69,40 a	4,10	85,70 a	3,80	74,90 a	3,66	80,50 a
Plantas propagadas <i>in vitro</i>	5,70	62,00 a	3,60	48,10 b	3,20	54,10 a	3,24	54,90 b
Corona de tubérculos (control)	5,60	58,30 a	3,90	72,50 a	1,40	11,30 b	3,58	75,30 a

Rangos medios con letras no comunes en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$ (n=50).

En las plantas de todos los materiales de plantación obtenidos *in vitro* se obtuvo como promedio 2,3 veces más tubérculos que en las plantas procedentes de las coronas de tubérculos de la propagación convencional, esto puede estar relacionado al efecto de rejuvenecimiento fisiológico y sanitario que produce el cultivo *in vitro*. Según Cardone *et al.* (2004), en estos tipos de materiales de plantación, el efecto de perder el tejido la señal que poseía de la planta madre, se puede manifestar en los mismos con un aumento en el vigor fisiológico de determinadas variables agronómicas. Los microtubérculos han sido considerados como un material vegetal de plantación ideal para iniciar programas de producción de “semillas” de alta calidad (Chen *et al.*, 2007). Los resultados del presente

trabajo para el cultivo del ñame así lo corroboraron, pues con ellos es posible obtener en campo un mayor índice de multiplicación. El mayor número de tubérculos que se obtuvieron en campo en las plantas de los microtubérculos posibilita insertarlos en un programa de producción de material vegetal de plantación de calidad y reducir el número de multiplicaciones que se le debe dar a los mismos en campo para satisfacer las necesidades de material vegetal de plantación certificado.

La respuesta que se obtuvo en las plantas de los microtubérculos de ñame con una masa fresca igual o superior a 3,0 g, se debió a que al presentar la mayor acumulación de sustancias de reservas, emergieron con mayor rapidez y uniformidad, y desarrollaron más rápido el follaje. El mayor desarrollo de follaje le permite a las plantas interceptar más radiación solar, realizar más fotosíntesis y sintetizar mayor cantidad de carbohidratos, que unido a la absorción de las sustancias minerales por las raíces, repercute en el crecimiento (Bonilla, 2001). Esto corrobora el criterio de que microtubérculos con mayor masa fresca pueden ser utilizados para la plantación directa en campo y que la masa fresca influye en la respuesta de estos en campo.

El rápido desarrollo vegetativo de las plantas procedentes de estos microtubérculos pudo haber permitido que se produjeran tubérculos por planta con una masa fresca que no difirió de las que presentaron las plantas de las coronas de tubérculos de la propagación convencional.

Kawakami *et al.* (2003) estudiaron el desarrollo y la producción en campo de las plantas de papa provenientes de microtubérculos y de tubérculos semilla convencional durante cuatro años. Estos investigadores sembraron tubérculos "semillas convencional" de unos 50 g y microtubérculos con una masa fresca de 0,5 a 1,0 g y de 1,0 a 3,0 g del cultivar 'Norin'. Ellos obtuvieron que a los 40 días después de la emergencia del follaje, el índice del área foliar fue el mismo y al momento de la cosecha la masa fresca de los tubérculos de las plantas

provenientes de microtubérculos fue un 82% de la masa de los tubérculos provenientes de plantas de tubérculos convencional. Aunque obtuvieron un menor rendimiento con los microtubérculos sugirieron que los mismos tienen un gran potencial para su uso como material vegetal de plantación en campo.

Los resultados del presente trabajo se comparan con los logrados por Jiménez (2005) pero en el cultivo de la papa. Este investigador evaluó la respuesta de las plantas de los microtubérculos de la variedad 'Atlantic' en campo en comparación con las de las plantas *in vitro* y obtuvo con las de los microtubérculos un mayor número de minitubérculos, los cuales presentaron 2,10 y 1,35 veces mayor masa fresca y diámetro respectivamente que los minitubérculos formados de las plantas que se desarrollaron de las plantas *in vitro*. Sin embargo, en el presente trabajo para el cultivo del ñame no se detectaron diferencias entre las plantas de los microtubérculos y las plantas que se desarrollaron de las plantas *in vitro* en cuanto al número de tallos y minitubérculos producidos por planta, pero sí en relación con la masa fresca de los tubérculos.

En las plantas de los microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' no se detectaron diferencias en los caracteres morfológicos cualitativos que se evaluaron en campo, sin embargo, entre las plantas de los microtubérculos, las plantas de los microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 3,0 g, mostraron las mejores respuestas en los caracteres cuantitativos que se evaluaron.

Los resultados obtenidos en este acápite permitieron concluir que los microtubérculos con una masa fresca superior a 3,0 g resultó el mejor material vegetal para la plantación directa en campo al presentar valores de brotación y supervivencia de las plantas similares a las secciones de tubérculo convencionales. Por otro lado, los microtubérculos con masa fresca entre 1,0 - 2,9 pueden ser también empleados para la plantación directa, pues mostraron valores de supervivencia de 87,0% que, aunque son inferiores a los obtenidos con los de

más de 3,0 gMF, resultaron similares a los descritos como aceptables para otras especies como la papa (Pérez, 2001; Kawakami *et al.* 2003; Jiménez, 2005; Özkaynak y Samaci, 2005; Naik y Karihaloo 2007).

Estos resultados confirmaron la importancia de la masa fresca de los microtubérculos para ser empleados como material vegetal plantación directo en campo y que aún es necesario continuar las investigaciones para incrementar la calidad de los microtubérculos, en especial con una masa fresca igual o mayor a 3,0 g.

4.3.2. Evaluación morfoagronómica de las plantas procedentes de la primera multiplicación vegetativa de los microtubérculos producidos en SIT

En la primera multiplicación vegetativa en campo de las plantas de microtubérculos no presentaron diferencias significativas en cuanto al número y longitud de los tallos por planta con las de las secciones de tubérculos que se obtuvieron de las plantas propagadas *in vitro*, ni con las de secciones de tubérculos de la propagación convencional (Control).

Los mejores resultados en cuanto al número de tubérculos por planta y masa fresca de los tubérculos (kg)/planta se obtuvieron en las plantas procedentes de los microtubérculos (3,80 y 4,12 kg) sin diferencias significativas con las que procedieron de secciones de tubérculos de plantas propagadas *in vitro* (3,60 y 4,04 kg), pero sí respecto con las que procedieron de las secciones de tubérculos que se obtuvieron de las plantas de la propagación convencional (Tabla 8).

La respuesta que se logró en una primera multiplicación vegetativa de las plantas de los materiales de plantación producidos *in vitro* en relación con las variables que se evaluaron (número de tubérculos/planta y masa fresca de los tubérculos (kg)/planta), respecto a las plantas de la propagación convencional, está muy relacionada con el efecto de rejuvenecimiento fisiológico y sanitario que producen los métodos de cultivo de tejidos *per se*. Estas plantas aún mantienen su potencial *in vitro*, reflejado en el mayor número de

tubérculos y en la masa fresca de los tubérculos que se obtuvieron por planta. Esto resulta de extraordinario valor si se desea establecer en este cultivo un programa de producción de material vegetal de plantación a partir de microtubérculos.

Tabla 8. Efecto de la procedencia de las secciones de tubérculos (100 gMF) en la respuesta de las plantas de ñame clon ‘Pacala Duclos’ a las 36 semanas de cultivo en la primera multiplicación vegetativa (MV1).

Secciones de tubérculos	Número de tubérculos/ planta		Masa fresca de los tubérculos (kg)/ planta	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
MV1 microtubérculos	3,80	64,50 a	4,12	78,10 a
MV1 plantas propagadas <i>in vitro</i> .	3,60	56,50 a	4,04	69,30 a
Propagación convencional	1,60	10,50 b	3,64	31,30 b

Rangos medios con letras no comunes en una misma columna difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* para $p < 0,05$ (n=50).

Los indicadores cualitativos y cuantitativos que se lograron con las plantas de los microtubérculos que se formaron en el SIT y su primera multiplicación vegetativa constituyen resultados novedosos y de elevado valor práctico que garantizan seguridad en la calidad del material vegetal de plantación que se produzca por estas técnicas.

El mayor vigor de las plantas procedentes de métodos biotecnológicos puede estar dado, según Pagliano (2004), por el rejuvenecimiento fisiológico, el no antagonismo con la macro y la microbiota que afecta a la planta en su hábitat natural y el saneamiento que se obtiene a través del cultivo de tejidos, por lo cual se hace difícil separar las tres causas.

Finalmente, se puede plantear que en un cultivo de reproducción asexual como el ñame, donde el material vegetal de plantación envejece fisiológicamente por los reiteradas multiplicaciones en campo y se deteriora por la acumulación de microorganismos, factores estos, que disminuyen de forma considerable el potencial de rendimiento del cultivo, resulta

imprescindible establecer un programa de producción de material vegetal de plantación, para el cual es necesario producir por métodos biotecnológicos el material vegetal original.

Los resultados en cuanto a la formación de microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' en el SIT aprovechables como material vegetal de plantación y la evaluación de la respuesta morfoagronómica de estos en campo no tienen precedentes en la literatura científica.

Para la tuberización *in vitro* de ñame se establecieron dos etapas de cultivo. En la etapa de crecimiento de las plantas, se definió, basado en la evaluación de indicadores morfológicos y fisiológicos de las plantas *in vitro* emplear el SIT. En la etapa de formación de microtubérculos también se alcanzaron los mejores resultados en cuanto al número de microtubérculos formados por frasco de cultivo (269,2), número de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g (241,8), porcentaje del contenido de masa seca (8,87%) y almidón (84,89 mg.gMF⁻¹) con este tipo de sistema de cultivo. Se logró al determinar el efecto de las condiciones de cultivo en el SIT, que con 15 minutos de inmersión cada seis horas, un volumen de 60 mL de medio de cultivo por planta *in vitro* y cuatro renovaciones del medio de cultivo (a las cuatro, ocho, doce y dieciséis semanas de cultivo), se formaran 317 microtubérculos por frasco de cultivo con una masa fresca superior a 1,0 g y de ellos 121 con una masa fresca igual o superior a 3,0 g.

Fue posible plantar los microtubérculos de ñame formados en el SIT directo en campo, aunque se determinó que aquellos con una masa fresca igual o superior a 3,0 g presentaron el mejor porcentaje de brotación (91,30%) y supervivencia de las plantas (96,50%). Otros resultados demostraron que no se presentaron cambios en los caracteres cualitativos en las plantas de los microtubérculos y que al plantar en campo secciones de tubérculos (100 g) procedentes de las plantas obtenidas de los microtubérculos se obtienen mejores resultados en cuanto al número y masa fresca de tubérculos que se produjeron en la primera

multiplicación vegetativa en comparación con las secciones de tubérculos procedentes de la propagación convencional.

Luego de una primera multiplicación vegetativa en campo de las plantas que se obtuvieron de los microtubérculos se obtuvo como promedio 7,4 veces más secciones de tubérculos "semilla" que por la propagación convencional. Esto implica que, comparado con el sistema convencional, el empleo de microtubérculos permite producir a partir de una ha inicial 7,4 veces más "semilla" luego de una multiplicación vegetativa en comparación con el método convencional. Esto por un lado significa que se puede producir una "semilla" de mayor calidad y además se pueden reducir las áreas dedicadas a la producción "semilla" al incrementarse los coeficientes de multiplicación y por ende la cantidad de material vegetal plantación producido por área, con los consiguientes ahorros de recursos y disminución de los costos.

Lo anteriormente planteado demuestra las potencialidades que tiene la formación de microtubérculos de ñame en SIT para ser incorporada en el programa nacional de producción de material vegetal de plantación para este clon propuesto por el INIVIT.

Finalmente, los resultados de este trabajo de tesis demostraron que es posible producir microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' en sistemas de inmersión temporal con una masa fresca que posibilita emplearlos como material vegetal para la plantación directa en campo y como semilla original en el programa nacional de producción de material vegetal de plantación de este clon de ñame. El esquema de trabajo propuesto se muestra en la Figura 18.

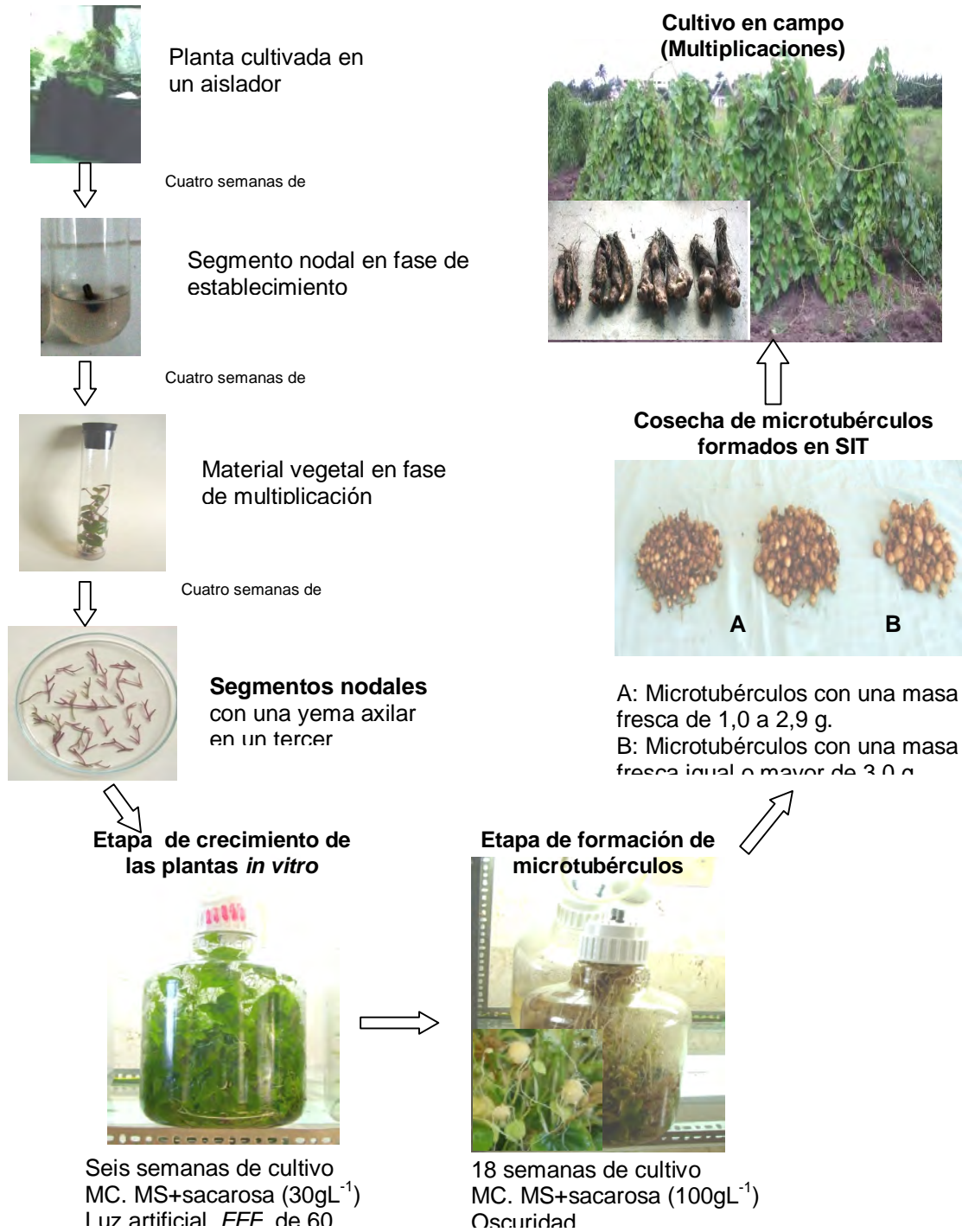


Figura 18. Esquema propuesto para la formación de microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal.

5. CONCLUSIONES

1. La tuberización *in vitro* de ñame clon 'Pacala Duclos' estuvo influenciada por los sistemas de cultivo en medio líquido. Aunque se formaron microtubérculos en los tres sistemas evaluados, con el sistema de inmersión temporal se obtuvieron los mejores resultados y fue posible incrementar el número y la masa fresca de estos lo cual permitió emplearlos como material vegetal para la plantación directa en campo.
2. La calidad de los microtubérculos obtenidos en SIT se corroboró por los resultados de las variables fisiológicas que se determinaron. En la etapa de crecimiento de las plantas estas mostraron la mayor actividad fotosintética ($15,30 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), y la menor transpiración ($5,97 \text{ mmol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y conductancia estomática ($457,00 \mu\text{mol H}_2\text{O} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). En la etapa de formación de microtubérculos los que se formaron presentaron el mayor contenido de masa seca (8,87%) y concentración de almidón ($84,98 \text{ mg} \cdot \text{gMF}^{-1}$).
3. Se incrementó el número de microtubérculos con una masa fresca igual o superior a 0,5 g por sistema de inmersión temporal (355) con 15 minutos de inmersión cada seis horas, un volumen de 60 mL de medio de cultivo por planta *in vitro*, y cuatro renovaciones de medio de cultivo a las cuatro, ocho, doce y dieciséis semanas de cultivo.
4. Se alcanzaron entre los materiales que se produjeron *in vitro*, con los microtubérculos de ñame con una masa fresca igual o superior a 3,0 g el más alto porcentaje de brotación (91,30%) y supervivencia de las plantas (96,50%), estas mostraron las mejores respuestas en los caracteres cuantitativos que se evaluaron en campo.
5. Las plantas procedentes de las secciones de tubérculos que se obtuvieron de las plantas de los microtubérculos mantuvieron aún el efecto del cultivo *in vitro per se*, al obtenerse el mayor número (3,80) y masa fresca (4,12 kg) de los tubérculos por planta en una primera multiplicación en campo.

6. RECOMENDACIONES

1. Emplear los sistemas de inmersión temporal para la formación de microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' e insertar el protocolo desarrollado en el programa nacional de producción de material vegetal de plantación para este clon.
2. Validar la respuesta del protocolo desarrollado en otros clones de interés en los programas de desarrollo de este cultivo y como una alternativa para el intercambio internacional de germoplasma.
3. Evaluar el efecto de la concentración de oxígeno y dióxido de carbono, y las potencialidades del cultivo fotomixotrófico con el objetivo de aumentar la eficiencia en cuanto a la formación de un mayor número de microtubérculos, con masa fresca igual o superior a 3,0 g en sistemas de inmersión temporal.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acha IA, Shiwashi H, Asiedu R & Akoroda MO. 2004. Effect of auxins on root development in yam (*Dioscorea rotundata*) vine. Tropical Science. Vol. 44 (2): 113-119.
- Afreen F. 2005. Physiological and anatomical characteristics of *in vitro* photoautotrophic plants. En: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system (Eds.) by T. Kozai, F. Afreen, SMA. Zobayed. pp. 59-87.
- Akita M & Takayama S. 1994. Induction and development of potato tubers in jar fermentor. Plant Cell Tissue and Organ Culture 36: 177-182.
- Akita M & Ohta Y. 1998. A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. Plant Cell Reports 18: 284-287.
- Amusa N, Adegbite A, Amuhammeda S & Baiyewu RA. 2003. Yam diseases and its management in Nigeria. African Journal of Biotechnology. Vol. 2 (12): 497-502.
- Aragón CE. 2005. Estudio de los principales indicadores del metabolismo del carbono en plantas de plátano (CEMSA $\frac{3}{4}$) propagadas en Biorreactores de Inmersión Temporal y durante su posterior aclimatización. Tesis para optar por el grado académico de Master en Biotecnología Vegetal. Universidad deiego de Ávila. Centro Bioplasmas. Cuba 76 p.
- Aragón C, Escalona M, Capote I, Pina D, Cejas I, Rodríguez R, Cañal M, Sandoval J, Roels S, Debergh P & González-Olmedo, J. 2009. Effect of sucrose, light and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 41: 550-554.

- Balogun MO, Ng SYC, Shiwachi H, Ng NQ & Fawole I. 2004. Comparative effects of explant sources and genotypes on microtuberization in yams (*Dioscorea* spp.). *Tropical Science*. Vol. 44 (4): 196-200.
- Balogun, MO. 2005. Development of microtuber production and dormancy control protocols for yam (*Dioscorea* spp.) germplasm conservation. PhD Thesis. University of Ibadan, Nigeria.
- Balogun MO, 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*. Vol. 46 (1): 55-59.
- Balogun MO. 2009. Microtubers in yam germplasm conservation and propagation: The status, the prospects and the constraints. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 4 (1): 1-10.
- Bazabakana R, Fauconnier ML, Diallo B, Dupont JP, Homes J & Jasiri M. 1999. Control of *Dioscorea alata* microtuber dormancy and germination by jasmonic acid. *Plant Growth Regulation* 27: 113-117.
- Bazabakana R, Wattiez R, Baucher M, Diallo B & Jaziri M. 2003. Effect of jasmonic acid on developmental morphology during *in vitro* tuberization of *Dioscorea alata* (L.). *Plant Growth Regulation* 40: 229-237.
- Berthouly M & Etienne H. 2005. Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (Ed). *Liquid Culture Systems or in vitro Plant Propagation*. pp. 165-195. Springer.
- Bonilla I. 2001. Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En: Azcon-Bieto J & Talon M. (Ed). *Fundamentos de fisiología vegetal*. pp. 113-131. Ediciones McGraw-Hill.

- Borges M, Meneses S, Aguilera N & Vázquez J. 2004. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76 (1): 87-89.
- Cabrera M, Gómez R, Rodríguez S, López J, Rayas A, Basail M, Santos A, Medero V & Rodríguez G. 2008. Efecto del estado físico y concentración de sacarosa presente en el medio de cultivo en combinación con el fotoperíodo sobre la formación de los microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.). <http://bva.fao.cu>.
- Cardone S, Olmos S & Echenique V. 2004. Variación somaclonal. En: Echenique V, Rubinstein C & Mroginski L. (Ed). *Biología y Mejoramiento Vegetal*. pp. 81-95. Springer.
- Chakrabarty D, Dewir YH, Hahn EJ, Datta S & Paek KY. 2006. The dynamics of nutrient utilization and growth of apple root stock 'M9 EMLA' in temporary versus continuous immersion bioreactors. *Plant Growth Regulation* 43: 184-189.
- Chajer AK, Sharma M, Kachhwaha S & Kothari L. 2008. Micronutrient optimization results into highly improved *in vitro* plant regeneration in kodo (*Paspalum scrobiculatum* L.) and finger (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) millets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 94:105–112.
- Chen FY, Wang D, Gao X & Wang L. 2007. The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation of *Dioscorea nipponica* Makino. *Plant Growth Regulation* 26: 38-45.
- Claassens MM & Vreugdenhil J. 2000. Is dormancy breaking of potato tubers the reverse of tuber initiation?. *Potato Research* 43: 347-369.
- Curtis WR. 2005. Application of bioreactor design principles to plant Micropropagation. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, 21–40. Springer.

- Donnelly J, Coleman DKW & Coleman S. 2003. Potato microtuber production and performance: A Review. *Amer. J. of Potato Res.* 80: 103-115.
- Escalona M, Samaon G, Borroto C & Desjardins Y. 2003. Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 39: 651-656.
- Escalona, M. 2006. Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual*: 48-50.
- Escalona M, Aragón C, Capote I, Pina D, Cejas I, Rodríguez R, Cañal M, Sandoval J, Roels S, Debergh P, Desjardins Y & González-Olmedo J. 2007. Physiology of effects of temporary immersion bioreactor (TIB) on micropropagated plantlets. *Acta Hort.* 748: 95-101.
- FAOSTAT. 2009. Disponible en: <http://www.fao.org>. Conectado el 7 de julio del 2009.
- Filipia R & Algora P. 1996. Métodos de reproducción acelerada de semilla de ñame. En: XXX Aniversario del INIVIT. Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Cuba. ISBN 832-5324-25-2.
- Forsyth C & Van Staden J. 1984. Tuberization of *Dioscorea bulbifera* stem nodes in culture. *J. Plant Physiol.* 115: 79-83.
- García M, Escalona M & Meneses S. 2004. Efecto de la concentración de sacarosa y de reguladores de crecimiento en la tuberización *in vitro* de ñame. *Biología Vegetal.* Vol. 4 (4): 184-187.
- George EF & Klerk GJ. 2008. The Components of Plant Tissue Culture Media I: Macro- and Micro-Nutrients. En: E. F. George *et al.* (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition, pp. 65–113.
- González JE. 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. 85 p.
- Gopal J, Iwama K & Jitsuyama Y. 2008. Effect of water stress mediated through agar on *in vitro* growth of potato. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 44 (3): 221-228.
- Hahn EJ & Paek KY. 2005. Multiplication of Chrysanthemum shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. En: A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. pp. 143–153. Springer.
- Hempfling T & Preil W. 2005. Application of a temporary immersion system in mass propagation of *Phalaenopsis*. En: A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. pp. 231–242. Springer.
- Hernández A, Pérez JM, Bosh D, Rivero L & Camacho E. 1999. Nueva versión de clasificación de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. AGRINFOR, Ministerio de la Agricultura, Ciudad de La Habana, Cuba. 64 p.
- ICIDCA. 1974. Manual de Técnica Análítica. p. 18.
- IPGRI/IITA. 1997. Descriptores para el ñame (*Dioscorea* spp.). Instituto Internacional del Agricultura Tropical, Ibadán, Nigeria/ Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.
- Ijoyah MO, Aba J & Ugannyan S. 2006. The effects of seedbed types on yam minisetts yield: A case study of Ushongo local government area of Benue state of Nigeria. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 5 (22): 2086-2091.
- Jackson MB. 2005. Aeration stress in plant tissue cultures. En: A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. pp. 459–473. Springer.

- Janssens M. 2001. Yam. En: Raemaekers R. (Ed). Crop production in tropical Africa. pp. 229-245.
- Jasik J & Mantell SH. 2000. Effect of jasmonic acid and its methylester on *in vitro* microtuberization of three food yam (*Dioscorea*) species. Plant Cell Reports 19: 863-867.
- Jean M & Cappadocia M. 1992. Effects of some growth regulators on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and *D. abyssinica* Hoch. Plant Cell Reports 11: 34-38.
- Jiménez E, Pérez N, DeFeria M, Barbon R, Capote A, Chávez M, Quiala E & Pérez JC. 1999. Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell Tissue and Organ Culture 59: 19-23.
- Jiménez E. 2005. Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (Ed). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation. pp. 197-211. Springer.
- Kawakami J, Iwama K, Hasegawa T & Jitsuyama Y. 2003. Growth and Yield of Potato Plants Grown from Microtubers in Fields. Amer J of Potato Res 80:371-378
- Kawakami J, Iwama K, Yutaka K & Jitsuyama Y. 2005. Effects of planting date on the growth and yield of two potato cultivars grown from microtubers and conventional seed tubers. Plant Production Science. Vol. 8 (1): 74-78.
- Kikuno H, Onjo M, Kusigemati K & Hayashi M. 2002. A relationship between the initiation of tuber enlargement and endogenous plant hormones in water yam (*Dioscorea alata* L.). Jpn. J. Trop. Agric. 46 (1): 39-46.
- Kim EK, Hahn EJ, Murthy HN & Paek KY. 2005. Enhanced shoot and bulblet proliferation of garlic (*Allium sativum* L.) in bioreactor systems. Journal of Horticulture Science & Biotechnology. 79 (5): 818-822.

- Kozai T & Kubota C. 2005. Unit and terminology use for the studies of photoautotrophic micropropagation. En: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system (Eds.) by T. Kozai, F. Afreen, SMA. Zobayed. pp. 6-17.
- Kozai T, Afreen F & Zobayed SMA. 2005. Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system (Eds.) by T. Kozai. pp. 1-5.
- Krikorian A. 1991. Medios de cultivos: Generalización, composición y preparación. En: Roca, W. & L. Mroginski (Ed). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. pp. 41-79.
- Labrada M, Millán A & Cruz G. 1997. Influencia de los brasinosteroides en la tuberización *in vitro* del ñame (*Dioscorea alata* L.). Centro Agrícola. Vol. 20 (1): 80-81.
- 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 (PhD). The University of Greenwich Natural Resources Institute. 123 p.
- Lichtenthaler, HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Meth. Enzym. 148: 350-382.
- Lowell L, Dilworth F, Omoruyi P & Helen N. 2007. *In vitro* availability of some essential minerals in commonly eaten processed and unprocessed Caribbean tuber crops. Biometals. Vol. 20 (1): 37-42.
- 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 Tissue and Organs and Culture 41: 229-235.

- Mantell S & Hugo A. 1989. Effect 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*. 16: 23-39.
- Martre P, Lacan D, Just D & Teison C. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 67: 25-35.
- Mbanaso ENA, Chukwu LI, & Opara, MUA. 2007. *In vitro* basal and nodal microtuberization in yam shoot cultures (*Dioscorea rotundata* Poir, cv. Obiaoturugo) under nutritional stress conditions. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6 (21): 2444-2446.
- McAlister B, Finnie J, Watt MP & Blakeway F. 2005. Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. pp. 425–442. Springer.
- Medero V, Del Sol L & García M. 1999. Metodología para la propagación del clon de ñame 'Blanco o Pelú'. Resúmenes del BioCat 99, Granma Cuba 5-7 de Octubre pp. 12.
- Mehrotra S, Manoj G, Arun K, and Bhartendu M. 2007. Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 6 (13): 1484-1492.
- Mendrano H & Flexas J. 2001. Fijación de dióxido de carbono y biosíntesis de fotoasimilatos. En: Azcon-Bieto J & Talon M. (Ed). *Fundamentos de fisiología vegetal*. pp. 173-187. Ediciones McGraw-Hill.
- Milián M, Girado Y, Beovides Y, Lago M, Hernández JC & Ruíz E. 2005. The germplasm bank an alternative to preserve the biodiversity. *Revista Internacional Agrisost*. Vol. 12 (1): 20-28.

- MINAG. 2008. Instructivo Técnico del Cultivo del Ñame. Castellanos, P. (Ed.). SEDGRI/AGRINFOR, Ciudad de La Habana, Cuba, 18 p.
- Mitchell SA, Asemota NH & Mohammad HA. 1995. Effects of explants source, culture medium strength and growth regulators on the *in vitro* propagation of three Jamaican yams (*Dioscorea cayenensis*, *D. trifida* and *D. rotundata*). J Sci Food Agric. 67 (4): 173-180.
- Murashige T & Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Naik PS & Karihaloo JL. 2007. Micropropagation for Production of Quality Potato Seed in Asia-Pacific. Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology, New Delhi, India. 54 P.
- Ng SYC. 1992. Micropropagation of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) Biotechnology in Agriculture and Forestry. 19: 136-159.
- Ng SYC & Ng NQ. 1997. Germplasm conservation in food yams (*Dioscorea* spp): Constraints, Application and Future prospects. In: conservation of plant Genetic resources *in vitro*. Volume 1: General Aspects. (Eds.) Razdan MK, Cocking EC. Science publishers Inc.U.S.A. pp. 257-286.
- NRAG. 1982. Análisis foliar. AGRINFOR, Ministerio de la Agricultura, Ciudad de La Habana, Cuba. 32 p.
- Ovono PO, Kevers C & Dommès J. 2007. Axillary proliferation and tuberization of *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex. Plant Cell Tissue and Organ Culture 91: 107-114.
- Özkaynak E & Samancı B. 2005. Yield and yield components of greenhouse, field and seed bed grown potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets. Akdeniz Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi. Vol. 18 (1): 125-129.

- Pagliano D. 2004. El papel de las nuevas biotecnologías en la producción agropecuaria. En: Echenique V, Rubinstein C & Mroginski L. (Ed). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. pp. 21-33.
- Pathirana R, Harris J, Marian J & McKenzie M. 2008. A comparison of microtubers and field-grown tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) for hexoses, sucrose and their ratios following postharvest cold storage. *Postharvest Biology and Technology*. Vol. 49 (1): 180-184.
- Paulo E & Ribeiro R. 2002. Growth and carbohydrate changes in shoot cultures of *Dioscorea* species as influenced by photoperiod, exogenous sucrose and cytokinin concentrations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70: 241-249.
- Perea M. 2001. Contribución de la biotecnología al desarrollo sostenible del cultivo del ñame. En: Perea, M. (Ed). Biotecnología Agrícola. pp. 289-301. Bogotá, D.C., Colombia.
- 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. Cuba. 85 p.
- Pérez N, de Feria M, Jiménez E, Capote A, Chávez M & Quiala E. 2001. Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la producción a gran escala de tubérculos *in vitro* de *Solanum tuberosum* L. var. Atlantic y estudio de su comportamiento en el campo. *Biotecnología Vegetal*. Vol. 1 (1): 11-17.
- Piao XC, Chakrabarty D, Hahn EJ. & Paek KY. 2003. A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. *Current Science*. Vol. 84 (8): 1129-1132.
- Porra RJ. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. *Photosynthesis Research* 73: 149–156.

- Preil W. 2005. General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* cultura. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*. pp. 1–18. Springer.
- Pruski K, Astatkie T, Duplessis P, Stewart L, Nowak J & Struik PC. 2003. Manipulation of microtubers for direct field utilization in seed production. *Amer J of Potato Res.* 80: 173-181.
- Ranalli P. 1997. Innovative propagation methods multiplication programmes in seed tuber. *Potato Research* 40: 439-45.
- Read, P. 2007. Micropropagation: Past, present and future. *Acta Hort.* 748: 17-28.
- Rodríguez S. 2004. Situación actual y perspectivas de los cultivos varios. Informe a la Asamblea Nacional del Poder Popular. Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana, 29 de Junio del 2004.
- Rodríguez S. 2006. Evaluación y recomendación de clones de boniato, yuca, ñame, plátanos y bananos resistentes o tolerantes a los factores adversos de la producción (FAP) y su manejo integrado. Informe final, Programa Nacional Científico. p. 67.
- Rodríguez W. 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo del ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*. Vol. 11 (2): 133-152.
- Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodriguez R & Debergh P. 2005. Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by Temporary immersion System. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 82: 57-66.
- Roels S, Noceda C, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodriguez R & Debergh P. 2006. The effect of headspace renewal in a Temporary Immersion Bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 84: 155–163.

- Ruíz E. 2003. Severidad del complejo de enfermedades foliares en el cultivo de ñame (*Dioscorea alata* L.) en diferentes densidades de siembra y soportes vivos de madera negra (*Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp y su rentabilidad en Azuero, Panamá. Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigaciones y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 102 p.
- Saborio F, Torres SA & Gómez L. 2002. Development of a clean-planting-material production system on tropical root and tuber crops, using *in vitro* propagated plants. *Scientia Horticulture* 641: 495-501.
- Salazar RD & Beltran JDH. 2003. Microtuberización en ñame (*Dioscorea alata* L.) var. 'Pico de botella'. *Revista Colombiana de Biotecnología*. Vol. 4 (2): 27-32.
- Salazar D & Hoyos S. 2007. Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. Vol. 60 (2): 3907-3921.
- Sarkar D. 2008. The signal transductions pathways controlling in plant tuberizations in potato: an emerging synthesis. *Plant Cell Reports* 27: 1-8.
- Savangikar VA, Savangikar C, Daga RS & Pathak S. 2005. Potentials for cost reduction in a new model of commercial micropropagation. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 403–414. Springer.
- Scarcelli N, Tostain S, Mariac C, Agbangla C, Da O, Berthaud J & Pham J. 2006. Genetic nature of yams (*Dioscorea* sp.) domesticated by farmers in Benin (West Africa). *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 121–130.
- Scott G, Rosegrant M & Ringler C. 2006. Roots and tubers for the 21st Century: Trends, projections, and policy options. *Food, Agriculture and the Environment Discussion* 31. Washington, DC: International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Potato Center (CIP).

- SIGMA. 1991. Catalogue Sigma Chemical Company. USA.
- Smith, DL & Scherk, WG. 1972. ASS. off analytical chemist. pp. 55-669.
- Takayama S & Misawa M. 1981. Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shake culture. Plant Cell Phisiol. 22: 462-467.
- Takayama S & Akita M. 2005. Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. A.K. Hvoslef-Eide and W. Preil (Eds.), Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 61–78. Springer.
- Tamiru M, Becker HC & Maass BL. 2008. Diversity, distribution and management of yam landraces (*Dioscorea* spp.) in Southern Ethiopia. Genet Resour Crop Evol. 55: 115-131.
- Teisson C, Alvard D, Berthouly M, Cote F, Escalant J, Etienne H & Lartand M. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. Acta Hort. 440: 521-526.
- Teisson C & Alvard D. 1999. *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. Potato Research 42: 499-504.
- Thomas W, Rufty J & Steven C. 1983. Changes in starch formation and activities of Sucrose Phosphate Syntyhase and cytoplasmic fructose-1-6-bisphosphatase in response to source-sink alterations. Plant Physiol. 72: 474-480.
- Tisserat B & Silman R. 2000. Interaction of cultures vessels, media volume, culture density, and carbon dioxide levels on lettuce and spearmint shoot growth *in vitro*. Plant Cell Reports. 19: 464-471.
- Vaillant V, Bade P & Constant C. 2005. Photoperiod affects the growth and development of yam plantlets obtained by *in vitro* propagation. Biologia Plantarum 49 (3): 355-359.
- Von Chong K. 2000. Manejo integrado de las enfermedades foliares del cultivo de ñame. IDIAP, Panamá.

- Wilson JE. 1989. Rapid multiplication of yams (*Dioscorea* spp.). Institute for Research, Extension and Training in Agriculture. IRETA Publication.
- Yu W, Joyce P, Cameron D & McCown B. 2000. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Reports* 19: 407-413.
- Ziv M. 2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticultural reviews*, Volume 24, Edited by Jules Janick. ISBN 0-471-33374-3: 1-29.
- Ziv M. 2005. Simple bioreactor for mass propagation of plants. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (Ed). *Liquid Culture Systems or in vitro Plant Propagation*. pp. 79-93. Springer.
- Zobayed SMA. 2005. Ventilation in micropropagation. En: Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system (Eds.) by T. Kozai, F. Afreen, SMA. Zobayed. pp. 143-182. Springer.

8. ANEXOS

Anexo 1. Listado de descriptores para ñame (*Dioscorea alata* L.) según IPGRI/IITA (1997).

7.1.4 Color del tallo joven.

(Observado 20 días después del brote)

1. Verde
2. Verde morado
3. Verde marrón
4. Marrón oscuro
5. Morado

7.1.7 Color de las alas del tallo joven.

(Observado 20 días después del brote)

1. Verde
2. Verde con bordes morados
3. Morado

7.1.18 Color del tallo maduro.

1. Verde
2. Verde morado
3. Verde marrón
4. Marrón oscuro
5. Morado

7.1.21 Diámetro del tallo (cm).

(Medido a 15 cm sobre la base de la planta)

1. Delgado (<3,0)
2. Medio (3,0-6,0)
3. Grueso (>6,0)

7.1.22 Forma de la sección transversal del tallo maduro en la base.

1. Cuadrada
2. Cuadrangular
3. Octogonal
4. Redonda

7.1.26 Tamaño de las alas del tallo maduro.

(Registrado a una altura de 1,0 m)

1. < 1,0 mm
2. 1,0-2,0 mm
3. >2,0 mm

7.1.27 Color de las alas del tallo maduro.

1. Verde
2. Verde con borde morados
3. Morado

7.1.28 Ausencia o presencia de cresta en el tallo maduro.

1. Ausente

2. Presente

7.1.34 Espinas en la base del tallo maduro.

1. Sin espinas
2. Pocas
3. Muchas

7.1.35 Espinas arriba de la base del tallo maduro.

1. Sin espinas
2. Pocas
3. Muchas

7.2.3 Color de las hojas jóvenes.

1. Amarillento
2. Verde claro
3. Verde oscuro
4. Verde morado
5. Morado

7.2.4 Color del borde de las hojas jóvenes.

1. Verde
2. Morado

7.2.5 Color de la nervadura de la hoja joven.

1. Amarillento
2. Verde
3. Morado claro
4. Morado

7.2.6 Color del pecíolo de la hoja joven.

1. Todo verde con la base morada
2. Todo verde con la junta de la hoja morada
3. Todo verde, morado en ambas puntas
4. Todo verde morado con base morada
5. Todo verde morado con junta de la hoja morada
6. Todo verde morado, ambas puntas moradas
7. Verde
8. Morado
9. Verde marrón
10. Marrón
11. Marrón
12. Marrón oscuro

7.2.7 Color del ala del pecíolo de la hoja joven.

1. Verde
2. Verde con bordes morados

-
3. Morado
- 7.2.15 Color de la hoja madura.**
1. Amarillenta
 2. Verde clara
 3. Verde oscura
 4. Verde morada
 5. Morada
- 7.2.16 Color de la nervadura de la hoja madura (haz).**
1. Amarillenta
 2. Verde
 3. Morada clara
 4. Morada
- 7.2.18 Color del borde de la hoja madura.**
1. Verde
 2. Morada
- 7.2.37. Color del pecíolo de la hoja madura.**
1. Todo verde con la base morada
 2. Todo verde con la junta de la hoja morada
 3. Todo verde, morado en ambas puntas
 4. Todo verde morado con base morada
 5. Todo verde morado con junta de la hoja morada
 6. Todo verde morado, ambas puntas moradas
 7. Verde
 8. Morado
 9. Verde marrón
 10. Marrón
 11. Marrón oscuro
- 7.2.38 Color del ala del pecíolo de la hoja madura.**
1. Verde
 2. Verde con bordes morados
 3. morado
- 7.5.1 Ausencia o presencia de tubérculos aéreos.**
1. Ausentes
 2. Presentes
- 7.6.14 Forma del tubérculo.**
1. Redondo
 2. Oval
 3. Oval-oblongo
 4. Cilíndrico
 5. Aplastado
 6. Irregular
- 7.6.29 Color de la piel en la cabeza del tubérculo.**
1. Blanco
 2. Blanco amarillento o blanco viejo
 3. Amarillo
 4. Naranja
 5. Morado claro
6. Morado
 7. Morado con blanco
 8. Blanco con morado
 9. Exterior morado/interior amarillento
- 7.6.30 Color de la pulpa en la sección transversal del centro.**
1. Blanco
 2. Blanco amarillento o blanco viejo
 3. Amarillento
 4. Naranja
 5. Morado claro
 6. Morado
 7. Morado blanco
 8. Blanco morado
 9. Exterior morado/ interior amarillento
- 7.6.31 Color de la pulpa en la parte inferior del tubérculo.**
1. Blanco
 2. Blanco amarillento o blanco viejo
 3. Amarillento
 4. Naranja
 5. Morado claro
 6. Morado
 7. Morado blanco
 8. Blanco morado
 9. Exterior morado/ interior amarillento

Anexo 2. Resultados de la evaluación de los caracteres cualitativos de las plantas de ñame clon 'Pacala Duclos' en un primera multiplicación en campo.

Descriptores	Microtuber. <1,0 gMF	Microtuber. 1,0 a 2,9 gmF	Microtuber. >3,0 gMF	Plantas <i>in vitro</i>	Coronas de tubérculos
Color del tallo joven	2	2	2	2	2
Color de las alas del tallo joven	2	2	2	2	2
Color del tallo maduro	2	2	2	2	2
Diámetro del tallo	2	2	2	2	2
Forma de la sección transversal del tallo maduro en la base	2	2	2	2	2
Tamaño de las alas del tallo maduro	2	2	2	2	2
Color de las alas del tallo maduro	2	2	2	2	2
Ausencia o presencia de cresta en el tallo maduro.	2	2	2	2	2
Espinas en la base del tallo maduro	1	1	1	1	1
Espinas arriba de la base del tallo maduro	1	1	1	1	1
Color de las hojas jóvenes	5	5	5	5	5
Color del borde de las hojas jóvenes	2	2	2	2	2
Color de la nervadura de la hoja joven	3	3	3	3	3
Color del pecíolo de la hoja joven	2	2	2	2	2
Color del ala del pecíolo de la hoja joven	2	2	2	2	2
Color de la hoja madura	1	1	1	1	1
Color de la nervadura de la hoja madura (haz)	2	2	2	2	2
Color del borde de la hoja madura	1	1	1	1	1
Color del pecíolo de la hoja madura	2	2	2	2	2
Color del ala del pecíolo de la hoja madura	2	2	2	2	2
Ausencia o presencia de tubérculos aéreos	1	1	1	1	1
Forma del tubérculo	3	3	3	3	3
Color de la piel en la cabeza del tubérculo	8	8	8	8	8
Color de la pulpa en la sección transversal del centro	1	1	1	1	1
Color de la pulpa en la parte inferior del tubérculo	1	1	1	1	1

Leyenda: Microtuber.: Microtubérculos