

## Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la multiplicación de segmentos nodales de *Dioscorea alata* L. en el clon 'Pacala Duclos'

Manuel Cabrera Jova\*, Milagros Basail Pérez, Yadenys Torres Núñez, Ania Robaina Jiménez, Arletys Santos Pino, Víctor Medero Vega, Aymé Rayas Cabrera, Jorge López Torres, Magaly García García, José de la C. Ventura y María Oliva Valdés. \* Autor para correspondencia.

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, INIVIT, Apartado 6, Santo Domingo CP. 53 000, Villa Clara, Cuba. e-mail: inivit@enet.cu

### RESUMEN

Con el propósito de desarrollar protocolos de propagación eficientes se emplearon para la multiplicación de segmentos nodales en el clon de ñame "Pacala Duclos" sistemas de inmersión temporal conformados por dos frascos de vidrio de 5 000 ml de capacidad. Se definieron como objetivos de trabajo: evaluar el tiempo y la frecuencia de inmersión, densidad de inóculo, tiempo y volumen de renovación del medio de cultivo y la duración de la fase de multiplicación sobre el coeficiente de multiplicación de los segmentos nodales. Los resultados permitieron definir que con el empleo de 10 minutos de inmersión y frecuencias de inmersión cada tres y seis horas, se alcanzaron los mayores incrementos en los coeficientes de multiplicación (10.1 y 9.8 respectivamente, sin diferencias significativas entre ellos). Con una densidad de 50 explantes por frasco de cultivo se obtuvieron los mejores resultados para el coeficiente de multiplicación (10.8). Cuando la renovación se realizó a los 24 días de cultivo con un volumen de 2 000 ml del medio de cultivo el coeficiente se incrementó a 14.1. Se determinó realizar el subcultivo a los 49 días de cultivo, pues se obtuvo el más alto coeficiente de multiplicación de 15.2. Un tiempo de cultivo mayor no influyó de forma significativa en el coeficiente de multiplicación.

Palabras clave: coeficiente de multiplicación, densidad de inóculo, *Dioscorea alata* L., medio de cultivo

### ABSTRACT

In order to develop efficient propagation protocols, temporary immersion systems composed by two glass flask with 5 000 ml of capacity were used to multiply nodals segments from yam clone "Pacala Duclos". The working objectives for evaluation were: time and frequency of immersion, inoculum density, time and renewal volume of culture medium and multiplication stage length on propagation coefficient of nodal segments. Results permitted to define that using 10 minutes immersion time and immersion frequency each three and six hours, the highest increments in the multiplication coefficients (10.1 and 9.8 respectively, without significant differences between them) were obtained. The most favorable result for the multiplication coefficient (10.8) was obtained when 50 explants per culture flask was inoculated. When the renewal was carried out 24 days after culture with 2 000 ml culture medium, the most advantageous result was shown for the multiplication coefficient, with 14.1. Subcultures were developed 49 days after culture because the highest coefficient multiplication (15.2) was noticed. A higher culture time did not influence in the multiplication coefficient significantly.

Key words: culture medium, *Dioscorea alata* L., inoculum density, multiplication coefficient

### INTRODUCCIÓN

El cultivo del ñame es una importante fuente de alimento para una gran parte de la población en las regiones tropicales. En Cuba se cultiva tradicionalmente en las regiones oriental y central del país. En este cultivo los tubérculos subterráneos son la parte útil de la planta, tanto para el consumo, como semilla para la próxima siembra. Esta especie desde que se comenzó a explotar por el hombre, se viene propagando de forma agámica por fracciones de tubérculos, las que al sembrarse de un año para otro en campo pueden ir acumulando microorganismos. Un programa de rescate de semillas es necesario para incrementar las áreas de producción del cultivo (Rodríguez, 2000).

La propagación *in vitro* de esta especie con el empleo de sistemas de cultivos semi-automatizados eficientes, como los sistemas de inmersión temporal (SIT), resulta indispensable en la estrategia de crear bancos de semillas que utilicen como material vegetal para la plantación, semillas sanas, rejuvenecidas y de mayor vigor productivo.

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) además de solucionar las dificultades de los cultivos en medios de cultivo líquidos incubados en condiciones estáticas, abren la posibilidad de automatizar algunas etapas del cultivo *in vitro* (Alvard *et al.*, 1993), permiten mayor facilidad de escalado y aumentan la eficiencia biológica y productiva del material vegetal propagado

(Escalona *et al.*, 1997; Lorenzo *et al.*, 1998; Ventura *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 1999). Al mismo tiempo la morfología y el comportamiento fisiológico de los cultivos en los SIT son muy semejantes a los que presentan las plantas en condiciones *ex vitro*, lo que permite una mayor tasa de supervivencia (Teisson y Alvard, 1994; González *et al.*, 1999).

Con el propósito de desarrollar un protocolo de propagación efectivo con el empleo de los sistemas de inmersión temporal se definieron como objetivos del trabajo: evaluar el tiempo y la frecuencia de inmersión, la densidad de inóculo, el tiempo y el volumen de renovación del medio de cultivo y la duración de la fase de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación de segmentos nodales del clon de ñame "Pacala Duclos"

## MATERIALES Y MÉTODOS

El sistema de inmersión temporal, estuvo conformado por dos frascos de vidrio de 5 000 ml de capacidad, uno para el crecimiento de los explantes y el otro como reservorio de medio de cultivo. Estos frascos se conectaron entre sí por una manguera de silicona de 6 mm de diámetro mediante conectores de vidrio que atraviesan la tapa. En la parte interna de los frascos se colocó una manguera menos flexible, la cual descendió hasta el fondo. El medio de cultivo circulaba de un frasco a otro en dependencia de la apertura o cierre de dos electroválvulas de tres vías, las cuales estaban conectadas a un temporizador programable para determinar la frecuencia y duración de la inmersión. En la entrada de los frascos se colocaron filtros hidrofóbicos (0.22  $\mu\text{m}$ , Midisart 2000, Sartorius AG) para garantizar la esterilidad del aire. La presión del aire fue regulada por un manómetro.

### Condiciones generales de cultivo

Cada sistema contenía inicialmente 1.0 litro de medio de cultivo de multiplicación, compuesto por el 100% de las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962), suplementado con 0.5  $\text{mg.l}^{-1}$  de Kinetina, 20  $\text{mg.l}^{-1}$  de cisteína, 30  $\text{g.l}^{-1}$  de sacarosa y pH 5.7, la esterilización se realizó en autoclave a 121°C y 1.1  $\text{kg.cm}^{-2}$  de presión durante un tiempo de 20 minutos.

Como material vegetal se emplearon segmentos nodales que incluyeron una yema axilar y se encontraban en el tercer subcultivo de multiplicación del clon 'Pacala Duclos', los cuales se sometieron a una etapa de detección de microorganismos. Para ello los explantes se colocaron en frascos de vidrio de 250 ml de capacidad con 25 ml de medio de cultivo líquido

y una densidad de inóculo de cinco explantes. Este material vegetal se mantuvo por tres días en condiciones de agitación (100 rpm) en cámaras de crecimiento con luz artificial con un fotoperíodo de 16 horas luz, una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de 42.0-48.0  $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y temperatura de 25 $\pm$ 2 °C. Los explantes libres de microorganismos contaminantes detectables visualmente fueron empleados como inóculo para los experimentos.

Se inocularon 50 explantes por cada frasco de cultivo excepto en el experimento donde se realizó el estudio de la densidad de inóculo.

Se evaluó en todos los experimentos a los 35 días de cultivo (excepto en el experimento donde se estudió el efecto del tiempo del cultivo, la longitud del tallo (cm), el número de entrenudos y se calculó el coeficiente de multiplicación al dividir el número final de brotes obtenidos en cada SIT entre el número inicial de explantes colocados. Todos los experimentos fueron repetidos en tres ocasiones en el tiempo con el objetivo de garantizar la repetibilidad y confiabilidad de los datos.

El procesamiento estadístico de los datos se realizó mediante el paquete SPSS para Windows versión 9.0, se aplicó un análisis de varianza de clasificación simple (completamente al azar) y la comparación múltiple de medias según la prueba de rangos múltiples de Duncan, excepto en el experimento donde se estudió el tiempo de inmersión en el cual los datos fueron procesados mediante una prueba de hipótesis para muestras independientes.

### Efecto del tiempo y la frecuencia de inmersión

Con el objetivo de evaluar la respuesta de la inmersión temporal sobre el cultivo, se estudiaron dos tiempos de inmersión de cinco y diez minutos cada una hora y tres frecuencias de inmersión, una, tres y seis horas con un tiempo de inmersión de diez minutos.

### Influencia de la densidad de inóculo

Se estudió, con el propósito de mejorar las condiciones de cultivo así como la eficiencia del proceso, la influencia de cuatro densidades de inóculo, 25, 50 75, 100 explantes/ frasco de cultivo.

### Efecto del tiempo de renovación y variación del volumen del medio de cultivo

Con la intención de mejorar la eficiencia del proceso, se estudió el efecto del tiempo de renovación y variación del volumen del medio de cultivo, se ensayaron cinco tratamientos (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos para la evaluación del efecto del tiempo de renovación y la variación del volumen del medio de cultivo en la multiplicación de ñame (clon Pacala duclos) en SIT.

Tratamiento	Tiempo de renovación (Días)	Volumen de medio de cultivo (ml)
1.	Control (Sin renovación del medio de cultivo)	-
2.	12	1 000
3.	12	2 000
4.	24	1 000
5.	24	2 000

### Efecto del tiempo de cultivo

Con el objetivo de mejorar la eficiencia en el uso de los frascos del sistemas de inmersión temporal para la multiplicación de explantes se estudió el efecto de seis tiempos de cultivo (28, 35, 42, 49, 54 y 63 días) sobre el desarrollo de los brotes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto del tiempo y la frecuencia de inmersión

Las figuras 1 y 2 muestran el efecto del tiempo y la frecuencia de inmersión, sobre el coeficiente de multiplicación de segmentos nodales del clon de ñame 'Pacala Duclos'. El tiempo de contacto de los explantes con el medio de cultivo mostró diferencias significativas entre los tratamientos estudiados. Al emplear un tiempo de inmersión de diez minutos cada una hora se obtuvo el más alto coeficiente de multiplicación (8.2).

Sin embargo, con este mismo tiempo (10 min.) cuando se emplearon frecuencias de inmersión de tres y seis horas se incrementaron los coeficientes de multiplicación sin diferencias significativas (10.1 y 9.8) en 35 días de cultivo.

La frecuencia y el tiempo de duración de la inmersión son factores muy importantes en la repuesta morfogénica entre las diferentes especies de plantas. Por ejemplo, en el cultivo del banano, se obtuvieron coeficientes de multiplicación de 15 en cuatro semanas, con el empleo de un tiempo y frecuencia de inmersión

de cinco minutos cada tres horas (Alvard *et al.*, 1993). De igual forma, en la multiplicación de yemas axilares en piña, se lograron coeficientes de multiplicación de 12 en seis semanas con el empleo de un tiempo y frecuencia de inmersión de dos minutos cada tres horas (Escalona, 1999).

### Influencia de la densidad de inóculo

La densidad de inóculo por frasco de cultivo en los sistemas de inmersión temporal tuvo influencia sobre el coeficiente de multiplicación de los segmentos nodales. Cuando se utilizó una densidad de 50 explantes por frasco de cultivo se obtuvieron los resultados más favorables para el coeficiente de multiplicación (10.8) en 35 días de cultivo, con diferencias significativas con respecto al resto de las densidades empleadas. Con esta densidad se logró la mejor utilización de la capacidad del frasco o lo que es lo mismo en términos de producción, un mejor aprovechamiento de la capacidad instalada en las cámaras de cultivo, lo que permite manejar un mayor número de explantes por área.

Orellana (1998), puntualizó la necesidad de valorar experimentalmente la densidad de explantes por frasco porque este parámetro pudiera ocasionar deficiencias en el sistema; ya que una baja densidad ocasionaría pérdidas de espacio y medio de cultivo, y con ello la subutilización de los recipientes; mientras que una alta densidad propiciaría un crecimiento limitado de los brotes e insuficiente proliferación con subcultivos más frecuentes.

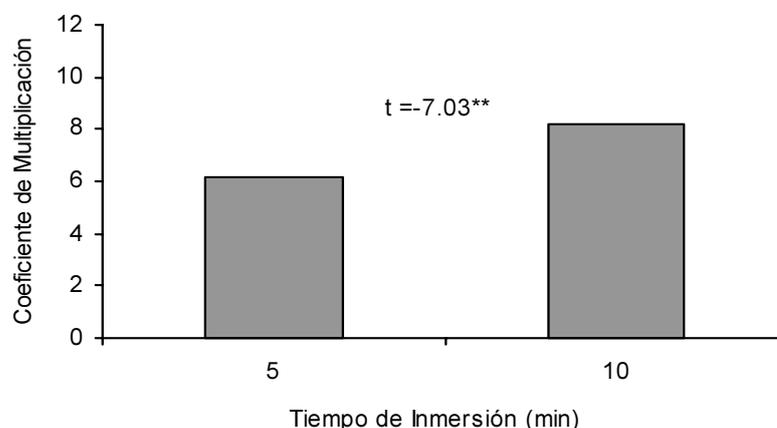
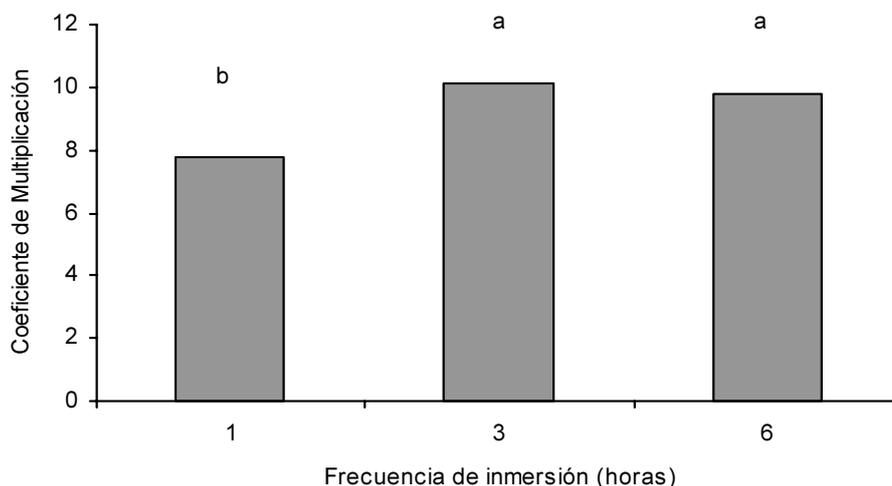


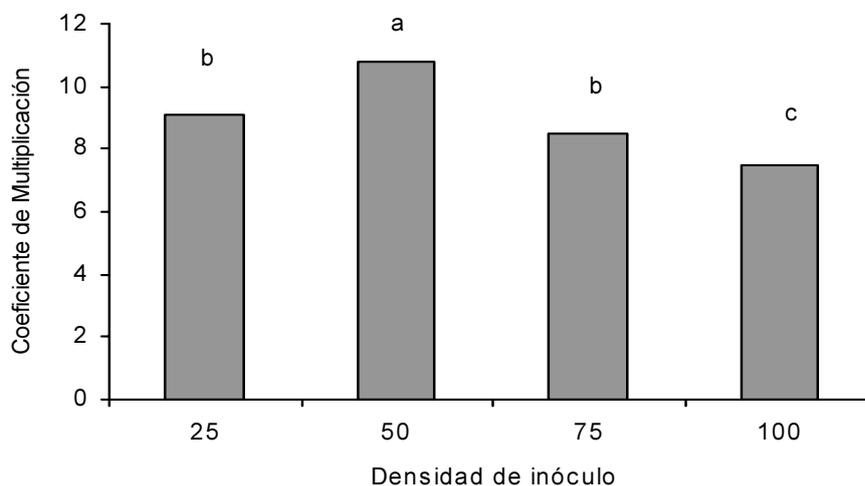
Figura 1. Efecto del tiempo de inmersión cada una hora sobre el coeficiente de multiplicación de segmentos nodales del clon de ñame 'Pacala Duclos' a los 35 días de cultivo.



ES - Error estándar

Valores con letras diferentes difieren estadísticamente según la prueba de rangos múltiples de Duncan para  $p < 0.05$ .

Figura 2. Efecto de la frecuencia de inmersión con el empleo de 10 minutos de inmersión sobre el coeficiente de multiplicación de segmentos nodales del clon de ñame 'Pacala Duclos' a los 35 días de cultivo.



Valores con letras diferentes difieren estadísticamente según la prueba de rangos múltiples de Duncan para  $p < 0.05$

Figura 3. Influencia de la densidad de inóculo sobre el coeficiente de multiplicación de segmentos nodales del clon de ñame 'Pacala Duclos' a los 35 días de cultivo. ES – Error estándar

De Feria *et al.* (2002) en la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum* spp. var IBP 89-112 estudiaron el efecto de la densidad de inoculación y concluyeron que con una densidad de 40 brotes por frasco, se lograba la mayor producción total de brotes.

#### Efecto del tiempo de renovación y volumen del medio de cultivo

El tiempo de renovación y el volumen de medio de cultivo influyeron sobre el coeficiente de multiplicación en el cultivo del ñame (Tabla 2). Siempre que se renovó el medio de cultivo hubo un incremento en la longitud del tallo, el número de entrenudos y el coeficiente de multiplicación. Cuando la renovación se realizó a los 24 días de cultivo con un volumen de 2 000 ml del medio de cultivo se obtuvieron los resultados más favorables para el coeficiente de multiplicación con 14.1

a los 35 días de cultivo, con diferencias significativas con respecto al resto de las variantes estudiadas.

De Feria *et al.* (2002) obtuvieron resultados similares en la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum* spp empleando los sistemas de inmersión temporal, siempre que renovó el medio de cultivo obtuvo se un aumento del coeficiente de multiplicación del número de brotes por frasco.

Este comportamiento puede ser explicado, entre otras, por dos razones, la primera relacionada con la mayor disponibilidad de nutrientes y la segunda por la posible eliminación de sustancias tóxicas que pueden haber sido excretadas al medio de cultivo por los explantes, aspectos que se mejoran al emplear los sistemas de inmersión temporal (Etienne y Berthouly, 2002).

Tabla 2. Efecto del tiempo de renovación y el volumen del medio de cultivo en la multiplicación de segmentos nodales del clon de ñame 'Pacala Duclos' con el empleo de Sistemas de Inmersión Temporal.

Tiempo de renovación (días) y Volumen de medio de cultivo (ml)	Longitud del tallo (cm)	No. de entrenudos	Coefficiente de multiplicación
Control	15.62 c	12.60 b	10.76 c
12 y 1 000	17.91 b	14.62 a	11.90 b
12 y 2 000	18.66 ab	14.83 a	12.16 b
24 y 1 000	18.70 ab	15.90 a	12.90 b
24 y 2 000	19.51 a	16.30 a	14.10 a
ES±	0.49*	0.28*	0.36*
CV (%)	8.52	8.76	9.18

ES: Error estándar.

CV: Coeficiente de variación.

Medias con letras desiguales dentro de cada columna difieren para  $P < 0.05$  según prueba de Duncan.

Tabla 3. Determinación de la duración más adecuada de la fase de multiplicación de segmentos nodales del clon de ñame 'Pacala Duclos' al emplear Sistemas de Inmersión Temporal.

Tiempo de cultivo (días)	Longitud del tallo (cm)	No. de entrenudos	Coefficiente de multiplicación
28	9.0 d	8.0 d	6.4 d
35	18.4 c	13.60 c	12.6 c
42	20.8 b	14.0 bc	13.6 bc
49	21.2 ab	15.6 a	15.2 a
56	22.2 ab	15.4 ab	14.8 a
63	23 a	15.6 a	14.6 ab
ES±	0.64*	0.48*	0.36*
CV (%)	7.6	10.23	6.41

ES: Error estándar

CV: Coeficiente de variación

Medias con letras desiguales dentro de cada columna difieren para  $P < 0.05$  según prueba de Duncan.

### Efecto del tiempo de cultivo

El tiempo de cultivo en los sistemas de inmersión temporal influyó sobre los parámetros evaluados (Tabla 3), en la medida que aumentó el tiempo de cultivo, se incrementó la longitud del tallo, el número de entrenudos y hubo un mayor aprovechamiento de los frascos instalados. El objetivo principal en la fase de multiplicación al utilizar los sistemas de inmersión temporal fue incrementar los coeficientes de multiplicación, se lograron los resultados más favorables cuando los segmentos nodales fueron cultivados durante 49, 54 y 63 días, sin diferencias significativas entre ellos. Cuando se realizó el subcultivo a los 49 días de cultivo se obtuvo el más alto coeficiente de multiplicación (15.2). Un tiempo de cultivo mayor no influyó de forma significativa en el coeficiente de multiplicación, por lo que al utilizar este tiempo de cultivo en los sistemas de inmersión temporal se logró realizar un máximo aprovechamiento de los frascos de cultivo y mejorar la eficiencia en la fase de multiplicación.

### CONCLUSIONES

En el presente trabajo se obtuvieron varios resultados que permiten el empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal para la multiplicación de segmentos nodales en el clon 'Pacala Duclos' (*Dioscorea alata* L.).

Se definió que con de 10 minutos de inmersión y frecuencias de inmersión cada tres y seis horas, se alcanzaron los mayores incrementos en los coeficientes de multiplicación.

Se comprobó que con una densidad de 50 explantes por frasco de cultivo se obtuvieron los resultados más favorables para el coeficiente de multiplicación.

Se determinó que cuando la renovación del medio de cultivo se realizó a los 24 días de cultivo con un volumen de 2 000 ml del medio de cultivo se incrementó el coeficiente de multiplicación.

Se obtuvo el más alto coeficiente de multiplicación cuando se realizó el subcultivo a los 49 días de cultivo.

## REFERENCIAS

- Alvard, D, Cote F y Teisson C (1993) Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55-60
- De Feria, M, Jiménez E, y Chavez M (2002) Empleo de sistemas de inmersión temporal para la multiplicación *in vitro* de brotes de *Saccharum* spp. var. IBP 89-112. *Biología Vegetal* 2 (3): 143-147
- Escalona, M (1999) Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr) en sistemas de inmersión temporal. Tesis para optar al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro de Bioplanta. Universidad de Ciego de Ávilas, Cuba. p. 94
- Escalona, M, González B, Lorenzo J, Daquinta M, Espinosa P, Fundora Z, Espinosa D y Borroto C (1997) Propagación *in vitro* de la piña en sistemas de inmersión temporal. *BioVeg '97. Técnicas de avanzada aplicadas a la propagación masiva de plantas*. Ciego de Avila, Cuba. Libro de resúmenes. p. 42
- Etienne, H y Berthouly M (2002) Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 251-231
- González, J, Rodríguez R, Rodríguez Y, Yáñez E, y Escalona M (1999) Caracterización de las condiciones de cultivo *in vitro* y la aclimatación de plántulas de piña y caña de azúcar. *BioVeg '99*. Ciego de Avila, Cuba. Libro de resúmenes. p. 28
- Jiménez, E, Pérez N, de Feria M, Barbón R, Capote A, Chavéz M, Quiala E y Pérez J.C (1999) Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 59: 19-23
- Lorenzo, J, González B, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, y Borroto C (1998) Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 197-200
- Orellana, P (1998). Propagación vía organogénesis. En: Pérez Ponce, JN (Ed) *Propagación y Mejora genética de Plantas por biotecnología*, pp. 151-176. IBP, Santa Clara
- Rodríguez, S (2000) 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. P67
- Teisson, C y Alvard D (1994) A new concept of plant *in vitro* cultivation liquid medium: Temporary immersion. En: *Proceedings of the 8<sup>th</sup> international congress on plant tissue and cell culture*, 12-17 June. pp. 105-110 Florence
- Ventura, J, Medero V, López J, García M, Rodríguez S, J. García y D. Reynaldo (1998) Manejo de los explantes en inmersión temporal, clon de banano FHIA-18. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal p 64. Palacio de convenciones de la Habana. FAO. Cuba.