

Aplicación de algunas técnicas de estadística multivariada al estudio de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata* L.

Edil Estrada Abeal¹, Misterbino Borges García^{1*}, Luis M. González Nuñez², Yanet Hernández Jerez¹, Rafael G. Kosky³, Bernard Malaurie⁴. *Autor para correspondencia.

¹Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma. Carretera Bayamo-Manzanillo km 17, Apdo 21, Bayamo 85 100, Granma, Cuba. e-mail: mborgesg@udg.co.cu

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias 'Jorge Dimitrov' GP 2140, Bayamo 85 100, Granma, Cuba.

³Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830

⁴Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR DIAPC, F-34 000 Montpellier, France.

RESUMEN

El uso racional de la estadística multivariada, el modelamiento y el conocimiento biológico pueden ayudar al investigador a diseñar con criterio un experimento crucial y llegar a conclusiones consistentes. Teniendo en cuenta lo anterior y el antecedente de un informe de conservación *in vitro* de *D. alata*, este trabajo tuvo como objetivo aplicar algunas técnicas de estadística multivariada para determinar las variables de mayor contribución a la diferenciación y agrupamiento de los tratamientos así como, definir el más adecuado para la preservación de los recursos genéticos de esta especie. Se evaluó mediante el análisis de componentes principales el proceso de conservación de *D. alata* a los 9 meses a través del porcentaje de: supervivencia, fenolización, explantes con hojas, enraizamiento, brotación y senescencia foliar; la longitud del vástago, el número de raíces y el número de nudos de novo por explante. Los resultados demostraron que las variables porcentaje de supervivencia, porcentaje de explantes con hojas, longitud del vástago, número de nudos de novo y número de raíces permiten explicar gran parte de la variación observada en los procesos de crecimiento y desarrollo. Por otra parte, el deterioro y envejecimiento de yemas de segmentos nodales conservados *in vitro* se explica en mayor medida por las variables porcentaje de fenolización y de senescencia foliar. Los mejores tratamientos para la conservación *in vitro* de *D. alata* L. sobre la base de las variables de mayor contribución en el análisis estadístico multivariado, correspondieron al medio de cultivo D - 571 con 1.5% de manitol; 0.1 ó 1 mg.l⁻¹ de BA, y 2 g.l⁻¹ de carbón activado.

Palabras clave: bencilaminopurina, carbón activado, componentes principales, conglomerados jerárquicos y ligamientos completos, manitol, fláme

ABSTRACT

Rational use of multivariate statistics, modeling and biological knowledge can help the researcher to design a tested crucial experiment and to reach consistent conclusions. This work based on this statement and on a previous report of *in vitro* conservation of *D. alata*. It aims to apply some multivariate statistical techniques to determine the main factors which contribute to differentiate and to group the treatments. The most suitable factors for the preservation of genetic resources of this species were also defined. The *D. alata* conservation process was evaluated by principal component analysis at 9 months. Percentage of survival, phenolization, explants with leaves, rooting, sprouting and leaf senescence, stem length, root number and number of novo nodes per explants were the analyzed variables. Results showed that the survival rate variables, percentage of explants with leaves, stem length, number of novo nodes and number of roots express much of the observed variation in the processes of growth and development. On the other hand, deterioration and aging of *in vitro* nodal segments buds is better explained by the percentage of phenolization variables and leaf senescence. The best treatments for *in vitro* conservation of *D. alata* based on variables with higher contribution in the multivariate statistical analysis, corresponded to the culture medium D - 571 with the 1.5% mannitol, 0.1 or 1 mg.l⁻¹ BA and 2 g.l⁻¹ of activated charcoal.

Keywords: activated charcoal, benzylaminopurine, cluster analysis, principal components, mannitol, yam

INTRODUCCIÓN

El análisis multivariado posee la propiedad de poder enfrentar a diferentes variables o factores independientes, juntos (asociados o no a covariables) con una o más variables dependientes. Uno de los métodos más usados es el análisis de componentes principales y por agrupación debido a la simplicidad de su algebra y su fácil interpretación. El análisis de componentes principales comprende un procedimiento matemático que transforma un conjunto de variables correlacionadas de respuesta en un conjunto menor de variables no correlacionadas llamadas componentes principales. La cuestión básica planteada para un análisis por agrupación es si es posible idear una clasificación o esquema de agrupación que permita dividir las unidades experimentales en clases o grupos, llamados agrupamientos, de modo que las unidades que estén dentro de una clase o grupo sean semejantes entre sí, en tanto que aquellas que pertenezcan a clases o grupos distintos no sean semejantes a las de los otros grupos (Johnson, 2000).

El análisis de componentes principales tiene como objetivo encontrar una estructura más simple reduciendo la dimensionalidad de las variables sin perder información. Cuando el investigador está interesado en definir grupos homogéneos de objetos y estudiar la estructura natural de las observaciones puede aplicar el análisis de *clusters*, que consiste en descomponer un conjunto de objetos en dos o más grupos basados en la similitud de los objetos debido a una serie de características especificadas. Dado que no es una técnica de inferencia estadística, para que los *clusters* de objetos exhiban la mayor homogeneidad interna y la mayor diferenciación entre *clusters* sólo se requiere que la muestra sea representativa y que las variables no sean multicolineales. En este análisis, además, sólo se deben incluir aquellas variables que contribuyan a caracterizar los objetos y que se encuentren relacionadas con los objetivos del análisis (Pérez, 2004).

La agrobiodiversidad de plantas cultivadas, elemento esencial de la seguridad alimentaria, está amenazada por los cambios contemporáneos mundiales, regionales y locales de la agricultura (Baco *et al.*, 2007).

Los clones de ñame (*Dioscorea* sp.) existentes en la colección cubana pertenecen fundamentalmente a las especies *D. alata*, *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. esculenta*, *D. bulbifera* y *D. trifida*. Las más extendidas son *D. alata*, *D. rotundata* y *D. cayenensis* (MINAGRI, 2004).

Las colecciones *in vitro* de ñame establecidas a partir del cultivo de yemas de segmentos nodales han sido referidas por varios autores. Por ejemplo, Mandal y Chandel (1993) mantenían, en el Instituto Nacional de Recursos Genéticos de la India, 41 genotipos en un medio de cultivo con bajas concentraciones de kinetina a 25°C con una frecuencia de subcultivo de 12 meses. Igualmente, Nair y Chandrababu (1994) conservaron *D. alata*, *D. rotundata* y *D. esculenta* en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) con la adición de 3% de manitol que redujo el crecimiento y mantuvo saludables los explantes durante 12 meses. En el IITA, Ng y Ng (1994) refirieron que lograron conservar una colección de 1 500 accesiones de 8 a 20 meses mediante la reducción de la temperatura de incubación (18 - 22°C). Sin embargo, Malaurie (2001) en el centro IRD (EX - ORSTOM) mantuvieron 200 genotipos, representados por 21 especies, con una frecuencia de subcultivo de 6 a 12 meses, en un medio de cultivo compuesto por las sales de Knop modificadas, vitaminas MS modificadas, 3% de sacarosa, 2 g.l⁻¹ de carbón activado y 200 mg.l⁻¹ de glutamina a temperatura estándar. En todos estos informes no se describe el uso de técnicas estadísticas de análisis multivariado para definir los indicadores de mayor influencia que permiten caracterizar el proceso de conservación *in vitro* del ñame.

El uso racional de la estadística multivariada, el modelamiento y el conocimiento biológico pueden ayudar al investigador a diseñar con criterio un experimento crucial y llegar a conclusiones consistentes (Bramardi, 2000). Teniendo en cuenta lo anterior y el antecedente de un informe de conservación *in vitro* de *D. alata* llevado a cabo por Borges *et al.* (2003), este trabajo tuvo como objetivo aplicar algunas técnicas de estadística multivariada para determinar las variables de mayor contribución a la diferenciación y agrupamiento de los tratamientos así como, definir el más adecuado para la preservación de los recursos genéticos de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se emplearon segmentos uninodales desprovistos de hojas con una longitud de 15 mm, obtenidos de plantas cultivadas *in vitro* durante 6 semanas (tercer subcultivo) de los clones de *Dioscorea alata* L. Blanco o Pelú, Belep, Cartagena, IRAT-72 y Ñame agua (procedentes del banco de germoplasma del INIVIT), los cuales se conservaron *in vitro* durante 9 meses en los siguientes tratamientos (Borges *et al.*, 2003) compuestos por el medio de cultivo D-571 (De la Cruz *et al.*, 1998) y los componentes variables manitol (M), bencilaminopurina (BA), y carbón activado (CA) (Tabla 1).

Inoculación de los explantes

Los segmentos uninodales (explantes) se inocularon con la polaridad normal en tubos de ensayo (18 x 150 mm) con 5 ml de medio de cultivo a razón de un explante por tubo.

Condiciones de cultivo

Durante todo el experimento se mantuvo la temperatura a $24.5 \pm 1^\circ\text{C}$, iluminación $36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 76 - 80%.

Evaluación

Fueron analizados 60 explantes por tratamiento a los 9 meses de cultivo. Se determinó el número de explantes vivos y se calculó el porcentaje de supervivencia. De 25 explantes por tratamiento seleccionados al azar se cuantificó el número de explantes fenolizados, el número de explantes con hojas y número de explantes con senescencia foliar, con estos datos se calculó el porcentaje para cada uno. Además, se midió la longitud del vástago (cm) y se contó el número de nudos de novo y el número de raíces por explante.

Diseño y análisis estadístico

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado sobre la base de los 12 tratamientos establecidos. A los datos se les realizó un análisis de componentes principales, con el propósito de establecer las variables de mayor contribución a la diferenciación de los tratamientos y sobre la base de dichas variables y las de mayor influencia en el proceso de conservación se utilizó un análisis de conglomerados jerárquicos y ligamientos completos para el agrupamiento de los tratamientos (Varela, 1998). Todos los análisis se realizaron con el paquete Statistica for WINDOWS, versión 8 (StatSoft, 2008).

Tabla 1. Tratamientos referidos por Borges *et al.* (2003) para la conservación *in vitro* de *D. alata* en medio de cultivo D-571 (De la Cruz *et al.*, 1998).

Tratamientos	Manitol (%)	BA (mg.l ⁻¹)	CA (g.l ⁻¹)
1	1.5	0.1	0
2	1.5	1.0	0
3	1.5	0.1	2
4	1.5	1.0	2
5	3.5	0.1	0
6	3.5	1.0	0
7	3.5	0.1	2
8	3.5	1.0	2
9	5.5	0.1	0
10	5.5	1.0	0
11	5.5	0.1	2
12	5.5	1.0	2

BA: bencilaminopurina, CA: carbón activado

Los resultados del análisis de componentes principales para variables de mayor contribución a la diferenciación de los tratamientos (Tabla 2) permitieron observar que en los dos primeros componentes se agrupó más del 90% de la varianza total entre las variantes estudiadas. Esto evidencia que las variables porcentaje de supervivencia, porcentaje de explantes con hojas, longitud del vástago, número de nudos de novo y número de raíces fueron las que mostraron mayor correlación con el eje 1 por lo que se presentan como las más importantes. Esto permite definir las responsables de los procesos de crecimiento y desarrollo, mientras que, en el segundo componente las variables de mayor correlación correspondieron al porcentaje de fenolización y de senescencia foliar, las cuales están relacionadas con los procesos de deterioro y envejecimiento del material vegetal. Esto explica el papel que revisten las variables analizadas como indicadores fundamentales para evaluar el proceso de conservación *in vitro* de yemas de segmentos uninodales de *D. alata* L. basado en la modificación del medio de cultivo. Esto coincide con lo señalado por varios autores que informan estas variables como los más importantes para monitorear la conservación *in vitro* de tejidos vegetales (Roca *et al.*, 1991; García *et al.*, 1999a; Espinosa *et al.*, 2003; Borges *et al.*, 2004; Balogun, 2009).

En función de las variables de mayor contribución en el componente y mediante el análisis de conglomerados jerárquicos y ligamientos completos los tratamientos evaluados se agruparon en cinco grupos diferentes (Tabla 3). El número 1, compuesto por los tratamientos 3 y 4 (1.5% de manitol; 0.1 ó 1 mg.l⁻¹ de BA; 2 g.l⁻¹ de carbón activado), se destacó por presentar los mayores indicadores de crecimiento y desarrollo y el menor porcentaje de fenolización; lo que indica que son los mejores tratamientos para la conservación *in vitro* de *D. alata*. Sin embargo, el grupo 3, compuesto por los tratamientos 9 y 10 (5.5% de manitol; 0.1 ó 1 mg.l⁻¹ de BA; 0 g.l⁻¹ de carbón activado), provocaron la muerte del material vegetal a partir de los siete meses de conservación.

Se comprobó que a medida que en los tratamientos se incrementaban las concentraciones de manitol se limitó el proceso de crecimiento, desarrollo y morfogénesis del material vegetal. A partir de los siete meses se observó un deterioro de los tejidos con la consiguiente detención del crecimiento, que provocó altos porcentajes de mortalidad y la muerte total de los segmentos uninodales en los tratamientos 11; 12 (5.5 % de manitol; 0.1 ó 1 mg.l⁻¹ de BA; 2 g.l⁻¹ de carbón activado) y 9; 10 (5.5% de manitol; 0.1 ó 1 mg.l⁻¹ de BA; 0 g.l⁻¹ de carbón activado), respectivamente.

Tabla 2. Análisis de componentes principales de las variables de mayor influencia en la conservación *in vitro* de *D. alata* durante 9 meses.

Variables	Componente 1	Componente 2
Porcentaje de senescencia foliar	0.54	0.73
Porcentaje de supervivencia	0.84	- 0.24
Porcentaje de explantes con hojas	0.88	0.37
Porcentaje de fenolización	- 0.36	0.83
Longitud del vástago	0.96	- 0.02
Números de nudos de novo	0.97	- 0.04
Número de raíces	0.98	- 0.17
Varianza	4.76	1.34
Contribución a la variación (%)	68.1	22.0
Variación total (%)		90.1

Tabla 3. Análisis de conglomerados jerárquicos y ligamientos completos de las variables de mayor influencia en la conservación *in vitro* de *D. alata* durante 9 meses.

G	T	%S	%EH	LV	NN	NR	%SF	%F
V	1; 2	84.5	94	23	3.2	5.3	24.3	100
IV	5; 6	78.5	0	9	1.7	3.2	0	100
III	9; 10	0	0	0	0	0	0	100
II	7; 8; 11; 12	71.5	0	11.5	1.3	3.6	0	10
I	3; 4	99	96	40.3	5	7.6	4.6	2

G, Grupos; T, tratamientos; %S, porcentaje de supervivencia; %EH, porcentaje de explantes con hojas; LV, longitud del vástago; NN, números de nudos de novo; NR, número de raíces; %SF, porcentaje de senescencia foliar; %F, porcentaje de fenolización.

Estos resultados no coinciden con los informados por Nair y Chandrababu (1994) al evaluar el efecto del manitol en la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata* los cuales lograron los mejores resultados (10 meses de conservación) en el medio de cultivo que contenía 50% de las sales y vitaminas MS, 3% de manitol, 20 g.l⁻¹ de sacarosa y 1 g.l⁻¹ de carbón activado, y Rayas *et al.* (2008) donde alcanzaron un crecimiento lento y mantenimiento saludable de los explantes (yemas de segmentos nodales de *D. alata*, *D. rotundata* y *D. esculenta*) durante 12 meses de conservación en un medio de cultivo MS con 3% de manitol.

En otras especies de plantas también se ha referido el uso de manitol combinado con otros factores como la temperatura para la conservación *in vitro*. Por ejemplo, Roca *et al.* (1991) conservaron *in vitro* yemas de yuca (*Manihot esculenta*), sin perder su viabilidad durante 18 meses a la temperatura comprendida entre 22 y 24°C e iluminación inferior a 9 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. García-Aguila *et al.* (1999a) realizaron la conservación de ápices de papaya (*Carica papaya*) procedentes de embriones somáticos cultivados *in vitro* en el medio de cultivo MS con la adición de manitol (0; 0.5; 1; 2 y 3%), donde observaron la existencia de una tendencia a disminuir la capacidad de crecimiento y morfogénesis de los explantes en la medida que se incrementaban las concentraciones de manitol. Igualmente, García *et al.* (1999b) lograron mantener *in vitro* hasta 12 meses diferentes clones de malanga (*Xanthosoma spp.* y *Colocasia sculenta*) en el medio de cultivo basal MS con distintas concentraciones de manitol,

BA y sacarosa sin deterioro fisiológico del material vegetal. Otros autores como Espinosa *et al.* (2002) indicaron un fuerte efecto de la adición de manitol al 2% en el medio de cultivo MS sobre el crecimiento de plantas *in vitro* de cuatro clones de boniato (*Ipomoea batata*) conservados *in vitro* durante 12 meses a 28 \pm 2°C e iluminación solar.

Merece destacar que en el agrupamiento de los distintos tratamientos tuvo un peso importante la presencia de carbón activado, al reunirse por separado los tratamientos con carbón activado de los que no presentaban esta sustancia en el medio de cultivo.

Durante la conservación *in vitro* hasta 9 meses se demostró un efecto de los tratamientos que presentaban carbón activado sobre la eliminación o disminución a porcentajes muy bajos de la fenolización de los explantes. Esto permitió su viabilidad si se compara con los que no contenían esta sustancia. En estos últimos se observó un oscurecimiento que se iniciaba en la parte próxima al material vegetal y se diseminaba en todo el medio de cultivo y provocaba un deterioro continuo de los tejidos y la muerte del explante. Los mayores valores se obtuvieron en las variantes con 3.5 y 5.5% de manitol; 0.1 ó 1 mg.l⁻¹ BA y en ausencia de carbón activado. Con relación a ello Jiménez (1998) planteó que las oxidaciones fenólicas pueden en ocasiones constituir un serio problema en el establecimiento y supervivencia de los cultivos *in vitro*, los cuales se manifiestan como un ennegrecimiento que comienza por la zona cercana del explante y se extiende a todo el medio de cultivo produciendo una seria afectación en el

crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte. También señala que en general los fenoles son productos extremadamente lábiles que se oxidan con gran facilidad. Estos productos oxidados pueden ser fitotóxicos y a la vez pueden incrementar los procesos de oxidación, debido a que después de oxidados se convierten a la vez en fuertes agentes oxidantes.

Arnolin (1989) observó el efecto de diferentes concentraciones de carbón activado (1 a 20 g.l⁻¹) sobre el desarrollo de yemas de segmentos nodales de *D. alata* y *D. cayenensis*, donde demostró que esta sustancia era efectiva a la concentración de 1 g.l⁻¹ para controlar la fitotoxicidad de las excreciones de los explantes en el medio de cultivo. En este sentido, Roca *et al.* (1991) observaron que la adición de carbón activado tenía un efecto positivo en el almacenamiento de brotes de yuca; reducía la defoliación, disminuía casi a la mitad el crecimiento de los brotes, limitaba la degradación de la clorofila y el ennegrecimiento de las raíces.

En este trabajo se enuncia y valida, por primera vez, de forma satisfactoria, en la práctica, la unión de las técnicas multivariadas de componentes principales y agrupación para monitorear los procesos de conservación *in vitro* y se demuestra la utilidad de este enfoque integrado especialmente para la preservación del germoplasma de ñame.

Peña (2002) señaló que la mayoría de los fenómenos biológicos son excesivamente complejos y se determinan de forma multifactorial, por lo tanto, se requiere del examen de múltiples dimensiones que generalmente están enlazadas unas con otras. Por esta razón, los investigadores necesitan evaluar un número de variables interrelacionadas que capturan aspectos específicos del fenómeno bajo consideración y eliminar el exceso de muchas variables que son redundantes y dejar sólo aquellas que tengan representatividad dentro del conjunto. Esto se consigue con la aplicación de las técnicas multivariadas de reducción de la dimensión tales como: análisis de componentes principales y de agrupación, que constituyen herramientas poderosas para la toma de decisiones en las diferentes disciplinas, pues dan respuesta a necesidades palpables y plenamente identificables.

CONCLUSIONES

Se demostró mediante la aplicación de algunas técnicas de estadística multivariada que es posible determinar las variables de mayor contribución a la diferenciación y agrupamiento de los tratamientos para la conservación de *D. alata*.

El análisis de componentes principales mostró que las variables más importantes para monitorear la conservación *in vitro* de yemas de segmentos nodales de *D. alata* corresponden al porcentaje de supervivencia, porcentaje de explantes con hojas, longitud del vástago, número de nudos de novo y número de raíces (caracterizan los procesos de crecimiento y desarrollo), así como, el porcentaje de fenolización y de senescencia foliar (caracterizan los mecanismos de deterioro y envejecimiento del material vegetal).

Por su parte, el análisis de conglomerados jerárquicos y ligamientos completos arrojó que los mejores tratamientos para la conservación *in vitro* de *D. alata* L. corresponden al medio de cultivo D - 571 con los niveles de 1.5% de manitol; 0.1 ó 1 mg.l⁻¹ de BA y 2 g.l⁻¹ de carbón activado.

REFERENCIAS

- Arnolin, R (1989) Effect de différentes concentrations de charbon végétal actif sur le développement *in vitro* de microboutures d'igname *Dioscorea alata* et *D. cayenensis*. 25e Congrès annuel. Guadeloupe Vol. XXV. pp. 671-678
- Baco, MN, Biaou G, Pinton F et Lescure JP (2007) Les savoirs paysans traditionnels conservent-ils encore l'agrobiodiversité au Bénin. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 11 (3): 201-210
- Balogun, MO (2009) Microtubers in yam germplasm conservation and propagation: The status, the prospects and the constraints. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 4 (1): 001-010
- Borges, M, Meneses S, Vazquez J, García M (2003) Conservación *in vitro* de Germoplasma de *Dioscorea alata* L. por crecimiento mínimo. *Plant Genetic Resources Newsletter* 133: 8-12
- Borges, M, Ceiro W, Meneses S, Aguilera N (2004) Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* L. germplasm maintained *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 87-90

- Bramardi SJ (2000) Estrategias para el análisis de datos en la caracterización de recursos fitogenéticos. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, p 47-52
- De la Cruz, G, Borges M, Aguilera N, Saborit G, Labrada M (1998) Multiplicación acelerada del ñame (*Dioscorea alata* L.) en condiciones *in vitro*. Resúmenes. III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana, Cuba, p.8
- Espinosa, A, Salas L, González O, Silva JJ (2002) Empleo del ácido abscísico, manitol y la disminución de las sales del medio de cultivo en la conservación *in vitro* de *Ipomoea batatas*. Biotecnología Vegetal 2 (1): 49-42
- Espinosa, A, González O, Silva JJ (2003) Conservación *in vitro* de clones de boniato en condiciones de crecimiento mínimo. Biotecnología Vegetal 3(1): 37-41
- García-Aguila, L, Posada-Pérez L, Kosky RG, Quiala L, Pérez B (1999a) Desarrollo de técnicas biotecnológicas para la conservación de híbridos de papaya (*Carica papaya* L.). En: libro de reportes cortos. 5to Coloquio Internacional de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba
- García, M, Rodríguez S, Medero V, Millan M, López J (1999b) Conservación *in vitro* de germoplasma de malanga (*Xanthosoma* spp. y *Colocasia esculenta*). Resúmenes BIOCAT-99, Granma, Cuba, p. 13.
- Jiménez, EA (1998) Cultivo de ápices y meristemas. En: Pérez, JN (ed). Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología, pp. 45–56. IBP. Santa Clara
- Jonson, DE (2000) Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos. Internacional Thomson Editores S.A.
- Malaurie, B (2001) Medium and long term conservation and safe international exchange of germplasm from food and cash tropical crops. Acta Horticulturae 560: 69-77
- Mandal, BB, Chandel KPS (1993) Conservation of genetic diversity in sweet potato and yams using *in vitro ex situ* strategies. Abst. International Symp. on tropical Tuber Crops, Trivandrum, India
- MINAGRI (2004) Instructivo técnico del cultivo del ñame. La Habana, 16 pp.
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473 – 497
- Nair, NG, Chandrababu S (1994) A slow growth medium for *in vitro* conservation of edible yams. Journal of Root Crops 20(1): 68 – 69
- Ng, NQ, Ng SYC (1994) Approaches for yam germplasm conservation. En: MO Akaroda, (ed.). Root Crops for Food security in Africa pp. 135 – 140 ISTRC–AB/CTA/IITA.
- Peña, D (2002) Análisis de datos multivariados. pp. 133-158. Mac Graw Hill, Madrid
- Pérez, C (2004) Técnicas de análisis multivariante de datos. Aplicaciones con SPSS. pp. 121- 154 Pearson, Madrid
- Rayas, A, Cabrera M, Gutiérrez V, García M, López J, Rodríguez S, Millán M, Medero V, Basail M, Santos A, Torres Y, Bauta M, Toledo H (2008) Efecto del manitol en la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata*. Resúmenes. VIII Simposio Internacional de Biotecnología Vegetal. IBP, UCLV, Santa Clara.
- Roca, WM, Arias DI, Chávez R (1991) Métodos de conservación *in vitro* del germoplasma. En: Roca WM y Mrogrinski L (Eds) Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones, pp. 697 – 713. CIAT, Cali
- StatSoft, Inc. (2008) Statistical for Windows. Release 8. Tulsa
- Varela, M (1998) Análisis Multivariado de Datos. Aplicación a las Ciencias Agrícolas, Matemática Aplicada, INCA, La Habana