

Efecto de diferentes formulaciones de vitaminas en la multiplicación *in vitro* de ñame clon caraqueño

Misterbino Borges García^{1*}, Yilian Pérez Tamames², Danaysi Zayas Fernandez¹. *Autor para la 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:borges@udg.co.cu

²Centro de Estudios de Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Granma. Carretera Bayamo-Manzanillo Km 17, Apdo 21, Bayamo 85 100, Granma, Cuba.

RESUMEN

El ñame es una planta de multiplicación vegetativa de gran importancia económica pero no se han realizado estudios donde se compare el efecto de diferentes formulaciones de vitaminas sobre la multiplicación *in vitro* de esta especie. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la influencia de la adición de distintas formulaciones de vitaminas en el medio de cultivo D-571 sobre la multiplicación *in vitro* de segmentos uninodales de ñame (*Dioscorea alata* L.). Se evaluaron a las 4, 5 y 6 semanas de cultivo el número de nudos de novo, la longitud del vástago y el número de hojas por explante. Los resultados arrojaron que las formulaciones de vitaminas en el medio de cultivo de multiplicación que resultaron adecuadas para el crecimiento y desarrollo de segmentos uninodales de ñame se correspondieron con los propuestos por Murashige y Skoog, Gamborg *et al.*, Morel y Wetmore modificada.

Palabras clave: *Dioscorea alata* L., cultivo *in vitro*, segmentos nodales

ABSTRACT

Multiplication of yam is very important from the economical point of view but studies comparing the effect of different vitamins formulation in the *in vitro* multiplication of this species have not been carried out. Influence of adding different vitamin formulations, in the culture medium D-571 on *in vitro* multiplication of yam uninodal segments (*Dioscorea alata* L.) was evaluated in the present research. Buds number, shoot length and leaves number by explants were determined after 4, 5 and 6 weeks of culture. Results demonstrated that the most appropriate vitamin formulations in the *in vitro* multiplication medium to facilitate growth and development of yam uninodal segments was the one proposed by Murashige and Skoog, Gamborg *et al.* and Morel and Wetmore modified.

Keywords: *Dioscorea alata* L., nodal segments, plant tissue culture

INTRODUCCIÓN

El ñame es una planta de multiplicación vegetativa cuyo cultivo en campo tiene diferentes inconvenientes tales como una baja tasa de multiplicación y problemas fitosanitarios. Además, una parte importante de la cosecha (25%) es utilizada como semilla para el año siguiente (Borges *et al.*, 2003).

El inicio del cultivo de tejidos en *Dioscorea* spp. se remonta a 1958 (Sawada *et al.*, 1958), desde esa fecha hasta hoy se han realizado estudios en sus diferentes especies. En Cuba se han desarrollado estudios para la micropropagación a partir de segmentos nodales de *D. alata* (De la Cruz *et al.*, 1998; Medero *et al.*, 1999). Además, se ha evaluado la optimización del medio de cultivo de propagación acelerada (Saborit, 2001), el comportamiento de clones de ñame a escala de Biofábrica (Guedes *et al.*, 1999), la aclimatización de clones de ñame (Aguilera *et al.*, 1999) y su conservación y regeneración *in vitro* (Borges *et al.*, 2003; 2004), así como la obtención de microtubérculos en Sistemas

de Inmersión temporal. Sin embargo, no se han realizado estudios donde se compare el efecto de diferentes formulaciones de vitaminas sobre la multiplicación *in vitro* de esta especie. Tomando en consideración lo antes expuesto el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la adición de distintas formulaciones de vitaminas en el medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de segmentos uninodales de ñame (*Dioscorea alata* L.) clon caraqueño.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material vegetal se utilizó la especie *Dioscorea alata* L. clon caraqueño. Los fragmentos de tubérculos sanos de 100 a 120 g fueron sembrados en condiciones semicontroladas dando lugar a plantas completas de las cuales se establecieron *in vitro* a partir de los dos meses de cultivo segmentos nodales de 12 a 15 mm de longitud (De la Cruz *et al.*, 1998). Posteriormente se emplearon segmentos uninodales de 12 a 15 mm de longitud, obtenidos de plantas *in vitro* cultivadas

durante 5 semanas (segundo subcultivo). Estos se colocaron con la polaridad normal (con la zona apical hacia arriba y la zona radical sobre el medio de cultivo) en frascos biotecnológicos (6 cm de ancho x 9 cm de altura con un diámetro de la abertura de 5.7 cm) con 20 ml de medio de cultivo a razón de cuatro explantes por frasco. Las condiciones de cultivo se llevaron a cabo con una temperatura de incubación de 25 ± 1 °C, humedad relativa del 70-80% y la iluminación solar de $60 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ con un fotoperíodo de 13 horas.

Como medio de cultivo basal se empleó el D-571 compuesto por: sales macronutrientes D – 567 (De la Cruz *et al.*, 1998); elementos micronutrientes de Duchter y Powell (1972) diluidos a un 25% de su concentración; hierro según Murashige y Skoog (1962); cisteína $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$. A este se le adicionaron diferentes formulaciones de vitaminas que consistieron en los siguientes tratamientos: Murashige y Skoog (1962) (Tratamiento 1, T1); Gamborg *et al.* (1968) (Tratamiento 2, T2); Morel y Wetmore (1951) Modificada (Tratamiento 3, T3); Murashige y Tucker (1969) (Tratamiento 4, T4, control).

A las 4, 5 y 6 semanas de cultivo se tomaron aleatoriamente 40 explantes por cada tratamiento a los cuales se les determinaron las siguientes variables: número de nudos de novo por explante longitud del vástago (medición con regla graduada en cm) y número de hojas totalmente extendidas por explante.

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado con análisis de varianza de clasificación simple y prueba de comparación múltiple de medias de mínima diferencia significativa para determinar la influencia de distintas formulaciones de vitaminas en la fase de multiplicación *in vitro* del ñame. El paquete estadístico utilizado fue el STATISTICA montado sobre plataforma WINDOWS XP Profesional versión 6.1 (StatSoft, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Número de nudos de novo

Se comprobó que las distintas formulaciones de vitaminas incorporadas en el medio de cultivo de multiplicación *in vitro* del ñame incrementaron significativamente, con respecto al control, el número de nudos de novo a las 4, 5 y 6 semanas de cultivo (Tabla 1). Estos resultados concuerdan con los informados por distintos autores como: Medero *et al.* (1999) en la micropropagación de diferentes clones de *D. alata* L y González *et al.* (2003) en la inducción de callos morfogénicos de boniato donde utilizaron con buenos resultados la formulación de vitaminas de Murashige y Skoog. Igualmente, Mitchel *et al.* (1995) en el establecimiento *in vitro* de ñames jamaiquinos (*Dioscorea* spp.) a partir de segmentos nodales emplearon con éxito el complejo vitamínico de Morel y Wetmore. Por otra parte, no coincide con los obtenidos por De la Cruz *et al.* (1998) en la multiplicación *in vitro* de *D. alata*, donde los mejores resultados fueron alcanzados con el uso del complejo vitamínico de Murashige y Tucker.

También es importante señalar que el índice de multiplicación adecuado para la transferencia del material vegetal del ñame, debe ser superior a 2.5, el cual se alcanza a las cuatro semanas de cultivo en el tratamiento 3 (medio D-571 con la adición de la formulación vitamínica de Morel y Wetmore modificada). Estos resultados concuerdan con los alcanzados por De la Cruz *et al.* (1998) y Medero *et al.* (1999) en la micropropagación de ñame donde lograron coeficientes de multiplicación superiores a 2.5 a las cuatro semanas de cultivo. En este sentido Saborit *et al.* (2001) al estudiar la influencia de las vitaminas en la tasa de multiplicación del ñame, demostró mediante un análisis de regresión múltiple, que los mayores coeficientes estaban dados por la combinación de los reactivos ácido nicotínico ($5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), piridoxina ($10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y mioinositol ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$).

Tabla 1. Influencia de la utilización de distintas formulaciones de vitaminas en el medio de cultivo de multiplicación *in vitro* del ñame (*Dioscorea alata* L.) sobre el número de nudos de novo a las 4, 5 y 6 semanas de cultivo

Tratamientos	Semana 4	Semana 5	Semana 6
T1	2.36a	3.08a	3.68
T2	2.2a	2.84a	3.32
T3	2.52a	3.16a	3.76
T4	1.6b	2.20b	2.40
DE	0.84	1.03	1.23

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según prueba de mínima diferencia significativa. T1, Vitaminas de Murashige y Skoog (1962); T2, Vitaminas de Gamborg *et al.* (1968); T3, Vitaminas de Morel y Wetmore (1951) modificadas, y T4, Vitaminas de Murashige y Tucker (1969) (Control). DE, desviación estándar.

Número de hojas

Los resultados fueron similares a los obtenidos para el número de nudos (Tabla 2) Esto evidencia que las vitaminas de los complejos vitamínicos de: Murashige y Skoog (tratamiento 1), Gamborg *et al.* (tratamiento 2) y Morel y Wetmore modificado (tratamiento 3) poseen un marcado efecto en el número de hojas el cual guarda una estrecha relación con el indicador fundamental de la multiplicación *in vitro* del ñame (número de nudos). Según Borges *et al.* (2003) esto puede ser debido a que durante la propagación *in vitro* del ñame se presenta un crecimiento y desarrollo vegetativo continuo de las hojas expresado en la formación de nuevas hojas y yemas, debido a una importante actividad de crecimiento y diferenciación desplegada por los tejidos meristemáticos en relación con el contenido nutritivo del medio de cultivo.

Longitud del vástago

El comportamiento de la longitud del vástago fue semejante a los resultados alcanzados para el número de nudos de novo y el número de hojas (Tabla 3). Estos resultados fueron similares a los referidos por varios autores como Mantell (1993) y Medero *et al.* (1999) los que han utilizado el medio de cultivo MS con la formulación de vitaminas de Murashige y Skoog y han alcanzado resultados satisfactorios para la micropropagación de *D. alata* con valores promedio similares para esta variable de crecimiento. Sin embargo, los resultados del presente trabajo no concuerdan con los obtenidos por De la Cruz *et al.* (1998); Saborit *et al.* (2001) y Borges *et al.* (2004a), los cuales han informado valores similares pero utilizando la formulación de vitaminas de Murashige y Tucker en el medio de cultivo D-571 para la micropropagación de diferentes clones de *D. alata* L, incluyendo el clon caraqueño.

Tabla 2. Influencia de la utilización de distintas formulaciones de vitaminas en el medio de cultivo de multiplicación *in vitro* del ñame (*Dioscorea alata* L.) sobre el número de hojas a las 4, 5 y 6 semanas de cultivo

Tratamientos	Semana 4	Semana 5	Semana 6
T1	4.04a	4.96a	5.88a
T2	3.6a	4.58a	5.24a
T3	4.16a	5.12a	6.20a
T4	3.0b	3.92b	4.36b
DE	1.42	1.56	1.85

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según prueba de mínima diferencia significativa. T1, Vitaminas de Murashige y Skoog (1962); T2, Vitaminas de Gamborg *et al.* (1968); T3, Vitaminas de Morel y Wetmore (1951) modificadas, y T4, Vitaminas de Murashige y Tucker (1969) (Control). DE, desviación estándar.

Tabla 3. Influencia de la utilización de distintas formulaciones de vitaminas en el medio de cultivo de multiplicación *in vitro* del ñame (*Dioscorea alata* L.) sobre la longitud del vástago (cm) a las 4, 5 y 6 semanas de cultivo

Tratamientos	Semana 4	Semana 5	Semana 6
T1	1.76a	2.46a	3.10a
T2	1.74a	2.57a	3.16a
T3	2.02a	2.76a	3.40a
T4	0.98b	1.60b	1.80b
DE	0.90	0.98	1.2

Medias con letras distintas difieren significativamente para $p < 0.05$ según prueba de mínima diferencia significativa. T1, Vitaminas de Murashige y Skoog (1962); T2, Vitaminas de Gamborg *et al.* (1968); T3, Vitaminas de Morel y Wetmore (1951) modificadas, y T4, Vitaminas de Murashige y Tucker (1969) (Control). DE, desviación estándar.

CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación indicaron que las formulaciones de vitaminas de Murashige y Skoog, Gamborg *et al.*, Morel y Wetmore modificado incorporadas al medio de cultivo de multiplicación *in vitro* del ñame (D-571) estimulan la elongación de las células y tejidos

del tallo, el cual conjuntamente con el número de nudos de novo constituyen los indicadores fundamentales en la micropropagación del ñame y pueden ser empleadas en sustitución de las propuestas por Murashige y Tucker que se incluyen en este medio de cultivo.

REFERENCIAS

- Aguilera N, Guedes L, Borges M (1999) Aclimatización de clones de ñame (*Dioscorea alata* L.). En: Libro de Reportes Cortos. Quinto Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, 16-19 junio. IBP. Santa Clara
- 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
- 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
- Cabrera M J, Kosky R, Basail PM, Santos AP, Medero VV, López JT, Rayas AC, García MG, Ventura JC (2005) Production of yam microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell Tissue and Organ Culture 83 (1): 103-107
- 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
- Dutcher R D, Powel LE (1972) Culture of apple shoots from buds *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort.Sci.97:5-11
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell. Res. 50:151-158
- González O, Milanes I, Silva JJ, Espinosa A, Acosta L (2003) Determinación de las concentraciones adecuadas de 2,4 D y 6-BAP para la inducción de callos morfogénicos de boniato. Biotecnología Vegetal. 3 (1): 25-29
- Guedes L, Aguilera N y Borges M (1999) Comportamiento de clones de ñame (*Dioscorea alata* L.) durante la multiplicación en Biofábrica. En: Libro de Reportes Cortos. Quinto Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, 16-19 junio. IBP. Santa Clara
- Mantell SH (1993) Integrated use of microporpagation and conventional propagation techniques for production of certified seed tubers of tropical yams (*Dioscorea alata* L) in adapted propagation techniques for commercial crop tropical. Proceedings of the Southeast Asian regional workshop on propagation techniques for commercial crops of the tropics. Ho Ching Minh city, Vietnam 7-12
- Medero V, Del Sol L, García M, López J, Ventura JC, Rodríguez S (1999) Metodología para la micropopagacion del ñame (*Dioscorea alata* L.). Resúmenes BIOCAT-99, Granma, Cuba, p.12
- Morel, G, Wetmore R (1951) Tissue culture of monocotyledons. Amer. J. Bot. 38: 138-140
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15: 473-497
- Murashige T, Tucker DPH (1969) Growth factor requirements of citrus tissue culture. Proc. 1st. citrus symp., 3: 1158
- Saborit GF, De la Cruz G, Meneses S, Estrada J (2001) Efecto de algunos factores del ambiente *in vitro* en la multiplicación del ñame. Revista alimentaria OCT; XXXVIII (326): 109-130
- Sawada E, Yakuwa T, Imakawa S (1958) Studies on the formation of arial tubers in Chinese yam. LI. On the arial tuber formation in sterile culture of vine segments. J. Hort. Assoc.27: 241-244
- StatSoft. (2003) Statistica for Windows. Release 6.1 Tulsa, OK