



Obtención de minitubérculos de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir) cv. 'Blanco de Guinea' a partir de plantas *in vitro* y su respuesta en campo

Tesis presentada en opción al Título Académico de
Master en Biotecnología Vegetal

Diplomante: Ing. Daniel Rodríguez Pérez

Tutores: Dr.C. Víctor R. Medero Vega

Dr.C. Rafael Gómez Kosky

Consultante: Dr.C. Yoel Beovides García

Santa Clara, 2015

... *“una semilla es el comienzo de un sueño, el que la siembra
la convierte en realidad”* ...

José Martí

A mis padres y en especial a mis hijos Jorge y Danelis

A todos muchas gracias por su confianza, apoyo y dedicación...

Han sido muchas las personas que me han apoyado y brindado su contribución incondicional para hacer posible la realización de este proyecto profesional. En especial, quiero agradecer:

- A la Revolución Cubana por darme la oportunidad de superarme en mi vida profesional.
- A la Dirección del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) por su apoyo y estímulo permanente para lograr el resultado.
- A mis hijos, padres y mis hermanos por su sacrificio y comprensión en los momentos difíciles.
- A los tutores el Dr.C. Víctor Medero Vega y el Dr.C. Rafael Gómez Kosky por sus orientaciones y su colaboración durante todo el período de trabajo.
- A mi consultante Dr.C. Yoel Beovides García por su ayuda incondicional y desinteresada en la realización de este trabajo.
- A la MSc. Aymé Rayas Cabrera, amiga y profesional cuyo apoyo y colaboración ha sido decisiva en la concreción de este trabajo.
- A los trabajadores del INIVIT, en especial a los de la Dirección de Biotecnología, por su ayuda en el logro de este resultado de superación espiritual y profesional.
- A los trabajadores del IBP, en especial a los profesores de la Maestría de Biotecnología Vegetal por sus enseñanzas, y particularmente a la DrC. Novisel Veitía por su cooperación en los análisis estadísticos.

A todos, mis más sinceros agradecimientos.

RESUMEN

Existen protocolos para la propagación *in vitro* del ñame 'Blanco de Guinea', sin embargo, la supervivencia en campo de las plantas *in vitro* y la producción de minitubérculos como material vegetal de plantación, son problemáticas pendientes de solución. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar la producción de minitubérculos de este clon de ñame en cámaras de umbráculo y su respuesta en condiciones de campo, para la producción de "semilla". Se evaluó el efecto de cuatro distancias de plantación entre plantas *in vitro* previamente aclimatizadas sobre la producción de minitubérculos. Los minitubérculos se clasificaron según su masa fresca (g) en cinco categorías y se evaluó su respuesta agronómica en campo para la producción de "semilla". Se estudió la influencia de la cantidad de minitubérculos por montículos (uno, dos, tres y cuatro) con una masa fresca superior a 16,0 g MF, sobre la producción de "semilla" en campo. Con la distancia de plantación de 0,10 x 0,10 m se logró el mayor número de minitubérculos por metro cuadrado (248) y con una masa fresca superior a 26,0 g, los cuales mostraron las mejores respuestas en campo en cuanto a brotación, supervivencia y masa fresca de los tubérculos producidos. Cuando se plantaron tres minitubérculos por montículo se obtuvo la mayor cantidad de tubérculos y con un mayor peso total. La metodología desarrollada permitió la obtención de material de plantación de calidad, lo cual contribuye a complementar el programa de producción de "semilla" del ñame 'Blanco de Guinea' y al desarrollo del cultivo.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	5
2.1. Generalidades del cultivo del ñame.....	5
2.1.1. Origen y distribución	5
2.1.2. Sistemática y botánica	5
2.2. Importancia económica y nutricional del cultivo	6
2.3. Características del clon ‘Blanco de Guinea’	8
2.4. Material de plantación en ñame	8
2.4.1. Método convencional	9
2.4.2. Métodos biotecnológicos.....	11
2.4.2.2 Producción de minitubérculos por vía biotecnológica	14
3. MATERIALES Y METODOS	20
3.1. Formación de minitubérculos a partir de plantas <i>in vitro</i> en condiciones semicontroladas.....	23
3.2. Respuesta en campo de los minitubérculos	24
3.2.1. Efecto del número de minitubérculos por montículo sobre la producción de “semilla”	25
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	27
4.1. Formación de minitubérculos a partir de plantas <i>in vitro</i> en condiciones semicontroladas.....	27
4.2. Respuesta en campo de los minitubérculos	35
4.2.1. Influencia del número de minitubérculos por montículo sobre la producción de “semilla”	40
5. CONCLUSIONES	44
6. RECOMENDACIONES	45
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46



1. INTRODUCCIÓN

En Cuba, la producción de ñame ha contribuido a la diversidad y estabilidad alimentaria, ya que tradicionalmente ha constituido una fuente importante de ingresos y empleos 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 adecuada 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.

La producción mundial de ñame en el año 2013 fue de 63,05 millones de toneladas con un rendimiento de 11 753,4 Kg.ha⁻¹ (11,7 t.ha⁻¹) (FAOSTAT, 2015). Debido a que tiene una amplia gama de usos: alimentos básicos (consumo fresco y en forma procesada), alimento animal y como materia prima para fines industriales, se ha convertido en una fuente cada vez más importante de alimento, empleo rural y de ingresos para la creciente población de los países en desarrollo (Tamiru *et al.*, 2008). Dentro de los genotipos comerciales, el clon de ñame 'Blanco de Guinea' se caracteriza por su adaptabilidad a las condiciones edafoclimáticas de las principales áreas agrícolas en el país, tiene alto valor nutritivo y aceptación por la población para su consumo fresco y en forma procesada. A diferencia de los clones comerciales de la especie *Dioscorea alata* L., este clon de la especie *Dioscorea rotundata* Poir. no produce bulbillos aéreos, por lo que entre el 35 y 40% de los tubérculos producidos deben ser utilizados como "semilla" para la plantación (MINAG, 2008).



De esta manera, la poca disponibilidad de “semilla” de ñame se presenta como la principal problemática a solucionar hacia un mayor desarrollo del ñame (Yan *et al.* 2011), y el cultivo de tejidos es una opción viable para resolverla. En ese sentido, en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), se han desarrollado protocolos para la propagación *in vitro* de algunos clones de ñame por organogénesis a partir de segmentos nodales (Medero *et al.*, 1999; Cabrera, 2010). En el caso del clon ‘Blanco de Guinea’, los bajos índices de multiplicación que presenta mediante la propagación convencional motivaron el desarrollo de protocolos específicos para su propagación *in vitro*, con vistas a su introducción en las biofábricas del país y así, ofrecer material de partida para desarrollar programas de producción de “semilla” de calidad en este cultivo (Cabrera *et al.*, 2012). Sin embargo, el ñame es un cultivo estacional con una época muy limitada para su plantación desde el 15 de marzo al 15 de abril (MINAG, 2008). Esta situación, junto a la existencia de condiciones desfavorables en la producción para el trasplante directo a campo de plantas *in vitro*, etapa en la que se producen elevados porcentajes de pérdidas (superiores al 80%), entre otras causas, influye negativamente sobre el nivel de adopción de la metodología de micropropagación a escala comercial y limita el alcance práctico de esos protocolos.

La producción de minitubérculos como material de plantación directo a campo ofrece ventajas en comparación con las plantas *in vitro* bajo las condiciones de producción y existen experiencias positivas en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L) (Jiménez *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2013). Los minitubérculos, como los microtubérculos, se pueden producir en cualquier época del año, pueden ser



almacenados en pequeños espacios durante un período determinado de tiempo, sin perder su potencial de brotación y ser utilizados como material vegetal de partida, en programas de producción de “semilla” para el desarrollo del cultivo en territorios que carecen de una infraestructura adecuada y de experiencia en el cultivo de tejidos (Cabrera *et al.*, 2011a).

Por tanto, es imprescindible disponer de una metodología que garantice la producción eficiente de minitubérculos de ñame y a la vez, que éstos expresen altos niveles de brotación y supervivencia bajo las condiciones de campo.

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

Si se logra producir minitubérculos de ñame en umbráculos a partir de plantas *in vitro*, que garanticen más del 90% de supervivencia durante la plantación en campo, entonces, se dispondrá de un material de plantación de calidad para la producción de “semilla” en el cultivo.

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

Objetivo General:

- Evaluar la formación de minitubérculos del clon de ñame ‘Blanco de Guinea’ en cámaras de umbráculo y su respuesta en condiciones de campo, para la producción de “semilla”.

Objetivos específicos:

- Lograr la formación de minitubérculos de ñame a partir de plantas *in vitro* en las cámaras de umbráculo.



- Evaluar la respuesta agronómica en campo de los minitubérculos producidos en cámaras de umbráculo y la influencia de la cantidad de ellos por montículo, sobre la producción de “semilla”.

Novedad científica

Por primera vez, hasta el momento, se logró la formación de minitubérculos de ñame en condiciones de cámaras de umbráculo a partir de plantas *in vitro*, específicamente para el clon ‘Blanco de Guinea’, lo cual posibilita utilizarlos como material de plantación.

Importancia práctica

El desarrollo de una metodología para la producción de minitubérculos de ñame ‘Blanco de Guinea’ a partir de plantas *in vitro*, garantiza la obtención de “semilla” de calidad para plantar directo en campo, con porcentajes de supervivencia superior al 90%. Además, la estrategia de plantar tres minitubérculos por montículo permite obtener una mayor cantidad de “semilla” en campo por unidad de área, con el consiguiente ahorro de recursos.



2. REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1. Generalidades del cultivo del ñame

2.1.1. Origen y distribución

El género *Dioscorea* comprende más de 600 especies originarias de diferentes áreas geográficas (Deepika *et al.*, 2013). La especie *Dioscorea rotundata* Poir es originaria de África Occidental; en muchos pueblos africanos del Pacífico y las zonas del Caribe, el ñame se cultiva en gran escala. En los trópicos ocupa las mayores áreas cultivadas y constituye una excelente fuente de carbohidratos (Tamiru *et al.*, 2008), también de proteínas y grasas, y en una menor proporción de minerales y vitaminas (Pacheco-Delahaye *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2013).

En Cuba este género está representado por 120 accesiones 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 se plantan y consumen en otras áreas del territorio nacional (Milián *et al.*, 2005).

2.1.2. Sistemática y botánica

Su ubicación taxonómica, según Janssens (2001), es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Dioscoreales*

Familia: *Dioscoreaceae*

Género: *Dioscorea*



Especie: *Dioscorea rotundata* Poir.

2.2. Importancia económica y nutricional 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 (*Manihot esculenta* Crantz) y boniato (*Ipomoea batatas* L.) para alimento animal y en la producción de almidón (Scott *et al.*, 2006).

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 muy 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 (Lowell *et al.*, 2007).

Dentro de este género se encuentran varias especies (*D. alata*, *D. bulbifera*, *D. trifida* y otras) que presentan excelente niveles nutricionales para la dieta alimenticia y procesos sencillos de cocción para el consumo humano (Ahmed y Urooj, 2008).

Un grupo de metabolitos presentes en el ñame son de interés para la medicina, algunos con efectos como antitrómbicos, mejoradores de enfermedades coronarias y la angina pectoral en el caso de *D. zingiberensis* (Li *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2011). También como anticancerígenos en el caso de *D. collettii* var. *hypoglauca* y *D.*



bulbifera (Hu y Yao, 2002; Lu *et al.*, 2009) y otros asociados a la gastritis (Pérez *et al.*, 2005). Igualmente, del ñame pueden aislarse diosgeninas y diocinas utilizados como expectorantes, antiinflamatorios, antifúngicos y antibacterianos (Azcon-Bieto y Talon, 2008; Jin *et al.*, 2010; Cho *et al.*, 2013). Se incluyen inmunoestimulantes y antioxidantes como la dioscorina en *D. alata* y mucopolisacáridos de *D. batata* con propiedades para terapias médicas con uso potencial para el bienestar humano (Choi *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2006; Han *et al.*, 2013).

A nivel industrial se emplea para la extracción de alcaloides y saponinas, particularmente las diosgeninas sirven para la elaboración de fármacos esteroidales, como cortisona, hormonas sexuales y anticonceptivos (Waizel-Bucay, 2009). Se ha incrementado la extracción de compuestos para la obtención de bioplástico como en el caso de *D. rotundata* que brinda una alternativa de manejo idónea con el ambiente (Tejeda *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, 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. Características del clon ‘Blanco de Guinea’

La especie *Dioscorea rotundata* Poir., es originaria de África y el clon ‘Blanco de Guinea’ fue prospectado en la región oriental de Cuba. 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 (INIVIT, 2012).

Se caracteriza por poseer hojas simples, abarquilladas, enteras y opuestas. Las hojas jóvenes son de color verde claro y las adultas de color verde. Presenta tallos de color verde, cilíndricos con abundantes espinas y se enrollan a la derecha, se caracteriza por tener pecíolos cilíndricos sin espinas, con coloración verde en el punto de inserción con el tallo y el limbo, es característico encontrar tubérculos solitarios generalmente gruesos, cilíndricos y de masa blanca. Este clon no emite bulbillos aéreos, los cuales tienen importancia como material de plantación en las especies que los producen.

2.4. Material de plantación en ñame

El desarrollo extensivo del cultivo del ñame en el sector estatal y los campesinos encargados de la producción de raíces y tubérculos en el país, está limitado por la poca disponibilidad de material de plantación de calidad. De los tubérculos cosechados, un tercio debe ser conservado por los agricultores para ser empleado como “semilla”, lo que representa entre el 35 y 40% de la producción comercial (MINAG, 2008). 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 post-cosecha, las cuales limitan la producción de material vegetal de plantación de calidad (Amusa *et al.*, 2003).

La antracnosis (*Colletotrichum gloesporoides* Penz.) 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, 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 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 los nemátodos, entre los cuales se encuentran *Scutellonema bradys* (Steiner & LeHew) Andrassy y *Pratylenchus coffeae* Goodey. Las 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 (Amusa *et al.*, 2003).

2.4.1. Método convencional

El ñame se propaga convencionalmente a través de tubérculos enteros o secciones de ellos con una masa fresca que oscile de 50 a 150 g, y también por bulbillos



aéreos (MINAG, 2012). Su principal limitante es el bajo índice de multiplicación (1:10) comparado con otros cultivos, por ejemplo, la papa (1:55) o los cereales (1:300). El material vegetal de plantación en ocasiones constituye el 50% del costo de producción total (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, pero presentó como principal desventaja la poca homogeneidad en la brotación.

Otra vía de propagación utilizada ha sido la multiplicación por 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 (Filipia y Pino, 1996).

Las técnicas de propagación convencional del ñame 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 de microtubérculos (Balogun, 2005; Tamiru *et al.*, 2008, Cabrera *et al.*, 2012).

Sin embargo las técnica de cultivo de tejidos vegetales a través de la propagación *in vitro* permite la producción masiva de plantas, libre de patógenos, a bajo costo, en un espacio reducido, en menor tiempo y bajo condiciones controladas (Calva y Pérez, 2005) con enfoques comerciales y agroindustriales, en cuanto a la producción de material vegetal para el establecimiento de cultivos y la generación de metabolitos secundarios. Además, constituye una alternativa para la conservación *in vitro* de



germoplasma y el intercambio de recursos fitogenéticos que involucran especies de *Dioscorea* (FAO, 2010).

El programa de producción de “semillas” propuesto por el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), pretende aumentar paulatinamente en los próximos años el uso de técnicas *in vitro* para reproducir cultivares de interés productivo, bajo el sistema oficial de certificación de semillas, hasta llegar a satisfacer las necesidades de material vegetal de plantación con calidad (Rodríguez, 2010).

2.4.2. Métodos biotecnológicos

El cultivo *in vitro* representa una alternativa eficiente para superar los problemas de calidad de “semilla” en la propagación convencional del ñame (Behera *et al.*, 2009). Las técnicas de cultivo *in vitro* se usan rutinariamente en el cultivo del ñame (Vaillant *et al.*, 2005), ya sea para la producción de plántulas (micropropagación) (Salazar y Hoyos, 2007; Cabrera *et al.*, 2011a; Yan *et al.*, 2011), conservación de germoplasma (Rayas *et al.*, 2008; Engelmann, 2011) la eliminación de bacterias contaminantes (Mbah y Wakil, 2012) o la producción de microtubérculos (Cabrera *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014). Los sistemas de inmersión temporal también han resultado útiles en la multiplicación del ñame (Polzin *et al.*, 2014).

2.4.2.1. Organogénesis

La producción de plantas *in vitro* en este cultivo ha alcanzado auge en los principales países productores (Nigeria, Costa de Marfil, Ghana) y es empleado en sus programas nacionales de semillas para la producción inicial del material vegetal de partida (Acha *et al.*, 2004, Vaillant *et al.*, 2005).



El cultivo de meristemas ha sido utilizado para la limpieza y saneamiento del material vegetal inicial que se quiere propagar (Malaurie *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 (Kim *et al.*, 2005; Kozai y Kubota, 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 y 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 riego e iluminación y se plantan en bolsas de polietileno que contienen *compost* como sustrato. En esta fase 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.

En la fase 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 medio de cultivo se le adicionan citoquininas. Entre 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 es lograr el establecimiento del material vegetal libre de contaminación microbiana y fisiológicamente vigoroso con el cual iniciar la posterior multiplicación.

La fase de multiplicación (Fase II) comprende la propagación 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±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



(AG₃), ácido naftalenacético (ANA), 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), recomiendan incrementar la intensidad luminosa con el objetivo de estimular el fortalecimiento de las plantas *in vitro*, que posteriormente serán trasplantadas a condiciones *ex vitro*.

La micropropagación concluye con la fase de aclimatización (IV), en esta etapa las plantas *in vitro* 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).

Según Primitiva *et al.* (2010), la etapa *ex vitro* es en la cual ocurre el mayor número de pérdidas de material vegetal, debido a que las condiciones de invernadero como la humedad, temperatura, luminosidad, no son adecuadas o el tipo de sustrato no es aséptico o la nutrición no es la apropiada, lo cual causa directamente la mortalidad de las plántulas.

2.4.2.2 Producción de minitubérculos por vía biotecnológica

La biotecnología ofrece alternativas eficientes para apoyar los programas de producción de “semilla” en cultivos de propagación asexual. Así, se crea un puente entre la rápida multiplicación *in vitro* y la proliferación en campo de los tubérculos, en lo cual la producción de minitubérculos en umbráculos o durante la fase de aclimatización, previa a su plantación en campo, es decisiva (Sharma y Pandey, 2013).



Este proceso es bien conocido en papa, en el cual pueden producirse los minitubérculos por muchas vías, incluida la plantación de plantas *in vitro* en alta densidad en cámaras de umbráculo o invernaderos (Wiersema *et al.*, 1987).

Por otra parte los microtubérculos ofrecen ventajas en comparación con otros tipos de material vegetal de plantación (Salazar y Beltrán, 2003). 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.

También pueden producirse minitubérculos a partir de plantas *in vitro* (Struik, 2007) o de los propios microtubérculos. De estas dos variantes, la primera, tiene varias ventajas sobre la segunda (Sharma y Pandey, 2013). Los minitubérculos, tienen la ventaja adicional por tener una mayor masa fresca, lo cual incide en lograr mejores niveles de brotación y de supervivencia en condiciones de campo (Carrasco *et al.*, 2004; Özkaynak y Samaci, 2005).

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 se consideran propágulos ideales para la producción de material vegetal de plantación de alta calidad.



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 habían 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 a estos 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 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 80,0 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 (Medero *et al.*, 1997; Ng y Ng, 1997); otras modificaciones también han resultado útiles (Salazar y Beltran, 2003; Balogun *et al.*, 2004).

Sin embargo, la supervivencia en condiciones de campo de los microtubérculos de ñame puede ser muy baja, al igual que en condiciones de umbráculos (Olivier *et al.*, 2012), resultado de un proceso largo (más de 32 semanas), lento y tedioso. Asiedu *et al.* (2003) y Donnelly *et al.* (2003) aseguraron que el uso de microtubérculos en la propagación del ñame tiene dos limitaciones principales: su largo período de dormancia y la falta de uniformidad en su brotación o germinación.



Una alternativa con mayores posibilidades sería desarrollar un protocolo que permita producir minitubérculos a partir de plantas *in vitro* en condiciones de umbráculo y luego, llevarlos a campo como material vegetal de plantación. En el caso de la papa, la producción de minitubérculos ha sido exitosa y de gran importancia para los esquemas de producción de “semilla” (Muthoni *et al.*, 2011; dos Santos *et al.*, 2012).

2.4.2.3. Producción de minitubérculos en condiciones semicontroladas

En ñame la producción de minitubérculos como material vegetal de plantación es casi nula pero existen otros cultivos como la papa donde este tema está muy bien documentado con resultados importantes y aplicación práctica en los esquemas nacionales de producción de “semilla”. En España Carrasco *et al.* (2008) en un estudio sobre la producción de minitubérculos de papa en comparación con el sistema convencional de producción, lograron: incrementar los índices de multiplicación y mejorar la sanidad de los minitubérculos, realizar una cosecha secuencial, optimizando el rendimiento por calibres y la homogeneidad de los lotes. Además, redujo el impacto ambiental de la producción al disminuir los gastos de agua, fertilizantes, productos fitosanitarios y de sustrato. Investigaciones anteriores en México, también afirman que ese sistema de propagación redujo los costos de producción e incrementó los rendimientos en un 25% (Maldonado, 1996).

Ranalli (1997) señaló que el tamaño y masa fresca de los minitubérculos en papa, está correlacionado con la duración del período de dormancia, un aspecto que influye en la utilidad de ellos en los esquemas de “semilla”. Según este investigador, los tubérculos pequeños, menores de 0,5 g, experimentaron deshidratación cuando fueron almacenados por un período de tiempo prolongado. Además, agrega que



cuando se plantaron en campo minitubérculos con una masa fresca superior a 25 g brotaron lentamente debido a la poca cantidad de sustancias de reservas y solo emergió un tallo por planta, el cual luego se ramificó y las plantas desarrollaron un escaso sistema radicular.

Según Kawakami *et al.* (2005), el tamaño y la masa fresca de los minitubérculos destinados para la plantación en campo determinan, en gran medida, su respuesta a las condiciones de cultivo. En experiencia de esos investigadores en papa, el poco desarrollo foliar de las plantas de los minitubérculos, disminuyó la cantidad de radiación solar que podía utilizarse, lo que disminuyó el crecimiento y la producción de materia seca. Esto provocó la obtención de bajos rendimientos en las plantas procedentes de minitubérculos en comparación con “semilla” tradicional, aspecto que limitó su incorporación en los programas de producción de “semillas” por métodos biotecnológicos.

Sin embargo, la mayoría de las investigaciones sobre la utilización de minitubérculos como material vegetal de plantación en papa muestran resultados muy positivos. Si bien la producción de “semilla” pre-básica de minitubérculos, a partir de plántulas *in vitro* de este cultivo, puede ser lenta y conducir a dificultades en la cadena de producción de semillas certificadas (Muthoni *et al.*, 2010), definitivamente es una alternativa eficiente para producir “semilla” de calidad en condiciones de campo (Muthoni *et al.*, 2011).

En el caso del ñame, Balogun (2009) señaló que para el uso de los minitubérculos para la propagación, en la conservación e intercambio de germoplasma, sería necesario desarrollar protocolos que permitieran la producción de minitubérculos con



una masa fresca que posibilitara reducir el período de dormancia, y garantizara el desarrollo post-brotación. Este investigador señaló que sería necesario conocer sobre sus posibilidades para la plantación directa en campo y el vigor de las plantas en estas condiciones, así como, conocer la supervivencia de las plantas procedentes de los minitubérculos en comparación con las plantas *in vitro*. También, se refirió a que las futuras investigaciones deberían estar dirigidas a conocer la posible variación genética en las plantas obtenidas de los minitubérculos, en términos de conocer su nivel de aplicabilidad. Igualmente, sugirió la necesidad de investigar sobre el número de generaciones que se necesitarían para que los minitubérculos produjeran tubérculos comparables a los utilizados usualmente como “semilla”. No obstante, sobre estos temas existen muy escasas investigaciones, en especial sobre la producción de los minitubérculos de ñame y su respuesta en condiciones de campo. En general, la formación de minitubérculos en el cultivo del ñame constituye una valiosa alternativa para la propagación de esta especie, en el sentido de que pueden constituir una fuente importante de “semilla” de alta calidad. Sin embargo, los protocolos desarrollados hasta el presente no tienen aplicación a escala comercial, debido fundamentalmente al bajo número de minitubérculos formados y a que los mismos no han tenido una masa fresca que garantice su supervivencia en campo. Esta situación ha limitado su aplicación para la plantación directa, en condiciones de campo, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas.



3. MATERIALES Y METODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba, en los 22° 35' de latitud norte y los 80° 18' de longitud oeste, a 40 metros sobre el nivel del mar (msnm), en cámaras de umbráculo y en áreas de campo durante el período comprendido entre septiembre del 2011 y mayo del 2014.

Procedimientos generales

Material vegetal

Se utilizaron tubérculos del clon de ñame 'Blanco de Guinea' (*Dioscorea rotundata* Poir.) procedente del Banco de Germoplasma del INIVIT. Estos fueron previamente seleccionados por sus características morfológicas según el listado de descriptores para la especie (IPGRI/IITA, 1997) y se plantaron en bolsas de polietileno negro que contenían materia orgánica (cachaza descompuesta) como sustrato y se cultivaron en condiciones semicontroladas, durante 45-60 días a partir del 15 de marzo de cada año.

Micropropagación

Para el establecimiento *in vitro* se tomaron los tallos procedentes de tubérculos previamente certificados como libres de patógenos virales (González, 2006). Estos se dividieron en segmentos nodales de aproximadamente tres centímetros de longitud, con una yema axilar, y se lavaron con detergente comercial (1,0 g.L⁻¹), luego 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 Murashige y Skoog (1962) (MS) que contenía kinetina (KIN) (1,0 mg.L⁻¹), ácido naftalenacético (ANA) (0,01 mg.L⁻¹) y 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa durante un período de 30 días. En la fase de multiplicación se empleó el medio de cultivo basal constituido por las sales y vitaminas MS con 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa; los subcultivos se realizaron cada 35 días (Cabrera *et al.*, 2008). Después de ocho subcultivos, las plantas se colocaron en un medio de cultivo similar al descrito anteriormente para su enraizamiento. En todos los casos se utilizaron como frasco de cultivo tubos de ensayo de 150 x15 mm.

Los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121°C de temperatura y una presión de 1,2 kg.cm⁻²; el tiempo de esterilización varió en dependencia del volumen de medio de cultivo. El instrumental (pinzas, espátulas y bisturíes) se desinfectó en un esterilizador eléctrico (DENT-EQ) que permaneció dentro del flujo laminar horizontal.

Las condiciones de cultivo fueron: temperatura 27 ± 2°C y régimen de 16 horas de luz (lámparas fluorescentes) con un flujo de fotones fotosintéticos o FFF de 24-48 μmol m⁻²s⁻¹) y ocho de oscuridad.

El manejo de los materiales biológicos (implantaciones, subcultivos y cambios de medios de cultivo), se realizó en condiciones de esterilidad en una cámara de flujo laminar horizontal.



La fase de aclimatización se desarrolló en condiciones semicontroladas en una casa de cultivo cubierta por una malla plástica (zarán), que permitía el paso de una densidad de FFF de $600 \text{ mmol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, según la metodología propuesta por Pérez *et al.* (1999). El riego se efectuó por microaspersión mediante un sistema *Microjet*, con una frecuencia de riego de 10 minutos cada 12 horas durante los primeros 30 días después de la plantación, luego se aplicó un riego de 15 minutos por día hasta dos semanas antes de efectuarse la cosecha. Se garantizó una humedad relativa del 85-90%.

Las cámaras de umbráculo (Figura 1) utilizadas tenían una dimensión de 20,0 m de largo, 1,0 m ancho y 0,20 m de profundidad y contenían como sustrato cachaza descompuesta. Las mismas se construyeron con bloques de hormigón de 20x50 cm y tenían una altura de 1 m; estaban ubicadas dentro del umbráculo (en condiciones semicontroladas cubiertas por una malla plástica o zarán).



Figura 1. Vista exterior del umbráculo (A) y de las cámaras (B) utilizadas en los experimentos realizados.



3.1. Formación de minitubérculos a partir de plantas *in vitro* en condiciones semicontroladas

Con el objetivo de evaluar el efecto de la distancia de plantación en la formación de minitubérculos a partir de plantas *in vitro*, se plantaron en el mes de junio aquellas plantas con una longitud de 20 cm o más y 3 ó 4 hojas, previamente aclimatizadas, según Rodríguez (2012). Se evaluaron cuatro distancias de plantación:

- I. 0,05 X 0,05 m;
- II. 0,10 X 0,10 m;
- III. 0,15 X 0,15 m y
- IV. 0,20 X 0,20 m.

En cada tratamiento se evaluaron todas plantas incluidas en un metro cuadrado; se utilizaron tres réplicas de cada uno por año. La cosecha de los minitubérculos se realizó de forma manual en el mes de febrero (ocho meses después del trasplante) y se evaluó por cada tratamiento el número de minitubérculos por plántula y su masa fresca (g MF). Se determinó el número total de minitubérculos cosechados por planta por metro cuadrado para cada distancia de plantación y su masa fresca. Los minitubérculos obtenidos en cada distancia fueron clasificados según su masa fresca en cinco categorías:

- I. de 5,0 g a 15,9 g;
- II. de 16,0 g a 25,9 g;
- III. de 26,0 g a 35,9 g;
- IV. de 36,0 g a 50,0 g y
- V. mayores de 50,0 g.



3.2. Respuesta en campo de los minitubérculos

Con el objetivo de determinar el efecto de la masa fresca de los minitubérculos producidos en las cámaras de umbráculo a la mejor distancia de plantación seleccionada. En campo se evaluó el porcentaje de brotación (%), la supervivencia (%) y el desarrollo general de las plantas derivadas de ellos. Se emplearon cinco tratamientos:

- Minitubérculos con una masa fresca de 16,0 – 25,9 g.
- Minitubérculos con una masa fresca de 26,0 – 35,9 g.
- Minitubérculos con una masa fresca de 36,0 – 50,0 g.
- Minitubérculos con una masa fresca superior a 50,0 g.
- Plantas *in vitro* aclimatizadas con una longitud del tallo de 20 cm y al menos cuatro hojas (Control).

A las cuatro semanas de la plantación en campo se determinó el número de minitubérculos que brotaron por parcela y se expresó en porcentaje (%). En la sexta semana se cuantificó la supervivencia de las plantas brotadas de los minitubérculos y se determinó el porcentaje (%).

A las 36 semanas de cultivo se realizó la cosecha y se seleccionaron 10 plantas de los montículos internos de cada parcela y se evaluó: número de tubérculos/planta y la masa fresca (kg MF) de los tubérculos/planta.

Este experimento se realizó durante dos años y se utilizó un diseño de bloques al azar, con tres parcelas experimentales (réplicas) por tratamiento. Las parcelas estuvieron formadas por cuatro hileras de montículos, con diez montículos por cada hilera, para un total de 40 montículos por parcela y 120 montículos por tratamiento.



Se analizaron estadísticamente los datos relativos al número de tubérculos/planta y masa fresca de los tubérculos/planta.

3.2.1. Efecto del número de minitubérculos por montículo sobre la producción de “semilla”

Con el objetivo de evaluar la influencia de la cantidad de minitubérculos por montículo, para la selección de los minitubérculos a plantar, se tuvo en cuenta los resultados del experimento anterior (acápite 3.2.), según los tratamientos siguientes:

- I. Un minitubérculo por montículo
- II. Dos minitubérculos por montículo
- III. Tres minitubérculos por montículo
- IV. Cuatro minitubérculos por montículo
- V. “Semilla” convencional (Coronas de tubérculos) (control)

Los experimentos se plantaron en un suelo Pardo mullido carbonatado (Hernández *et al.*, 1999). Las plantaciones en campo se realizaron en el mes de Abril de 2012-2014.

La distancia de plantación fue de 1,00 x 1,00 m.

En los experimentos de campo, el riego, las atenciones culturales y el control de plagas se realizaron según el Instructivo Técnico para la Producción de “Semillas” de Viandas (INIVIT, 2012).

A las 36 semanas (durante la cosecha) se seleccionaron 10 plantas de los montículos internos de cada parcela y se evaluaron las variables siguientes: número de tubérculos/planta y masa fresca (kg) de los tubérculos/planta.



Los datos relativos al porcentaje de brotación de los minitubérculos, porcentaje de supervivencia de las plantas, número de tubérculos/planta y masa fresca de los tubérculos/planta fueron procesados estadísticamente.

Análisis estadísticos

Para los análisis estadísticos se utilizó el paquete de programas SPSS para Windows® de 2012. La normalidad de las variables se determinó mediante la prueba de Shapiro-Wilk, la comparación entre medias se realizó con la alternativa no paramétrica de análisis de varianza o prueba de *Kruskall Wallis* y para la comparación entre parejas de grupo la prueba de Mann-Whitney. En todos los casos las diferencias significativas se establecieron para $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Formación de minitubérculos a partir de plantas *in vitro* en condiciones semicontroladas

En la formación de minitubérculos a partir de las plantas *in vitro* en las cámaras de umbráculo, se obtuvo que la distancia de plantación influyó en el número y en la masa fresca de los minitubérculos producidos por planta. Cuando se plantaron a distancias de 0,10 X 0,10 m y 0,15 X 0,15 m se obtuvieron los mejores resultados en cuanto al número de minitubérculos por planta (3,83 y 3,12 respectivamente) sin diferencias significativas entre ellas, pero sí con el resto de las distancias de plantación utilizadas (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la distancia de plantación de las plantas *in vitro* del clon de ñame 'Blanco de Guinea' sobre la formación de minitubérculos.

Tratamientos	Número de minitubérculos por planta		Masa fresca de los Minitubérculos (g)
	Media	Media de rango	
0,05 X 0,05 m	1,42	45,67 b	20,30 d
0,10 X 0,10 m	3,83	73,12 a	45,56 c
0,15 X 0,15 m	3,12	67,89 a	75,34 b
0,20 X 0,20 m	1,23	41,23 b	100,12 a
ES ±			0,17

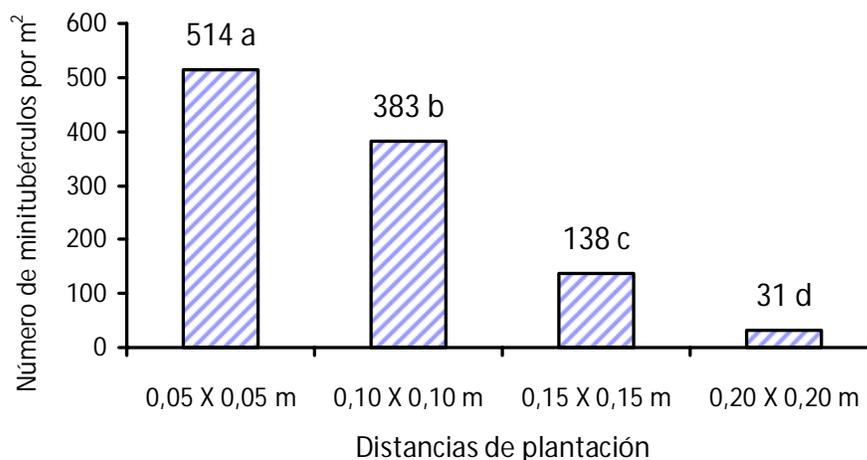
Rangos medios con letras no comunes para el número de minitubérculos por planta difieren según la prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis/Mann Whitney* para $p < 0,05$. Medias de rango con letras no comunes para la masa fresca de los minitubérculos difieren según prueba de *Tukey* para $p < 0,05$.

En cuanto a la masa fresca de los minitubérculos por planta, cuando se sembraron las plantas *in vitro* a la mayor distancia estudiada (0,20 X 0,20 m), se obtuvieron los más altos valores (100,12 g), con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos utilizados.

No se han encontrado experiencias de estudios similares en ñame en la literatura consultada, sin embargo, en papa, varios autores refieren haber obtenido entre 5,0 y 7,4 minitubérculos.planta⁻¹ (Andriolo *et al.*, 2005; Favoretto, 2005). Sharma *et al.* (2013), al estudiar la formación de minitubérculos en siete variedades de papa de la India en condiciones de umbráculo, también concluyeron que al aumentar la distancia entre las plantas *in vitro*, aumentó la masa fresca de los tubérculos al tiempo que disminuyó su cantidad por planta.

La distancia de plantación de las plantas *in vitro* influyó en el número total de minitubérculos por metro cuadrado (m²). En la menor distancia de plantación empleada (0,05 X 0,05 m) se obtuvo el mayor número de minitubérculos por m² y en la medida que se fue espaciando la distancia de plantación disminuyó el número de ellos por m² (Figura 2).

En el cultivo de la papa, según Wiersema (1987), los tubérculos producidos con alta densidad de tallos (más plantas por unidad de área o más tallos por planta) fueron más pequeños que los producidos con baja densidad (mayor proporción de tubérculos pequeños). Al mismo tiempo, cuando se incrementó la densidad de tallos disminuyó la cantidad de tubérculos producidos y se redujo la tasa de multiplicación debido a la aparición de tubérculos de mayor masa fresca.



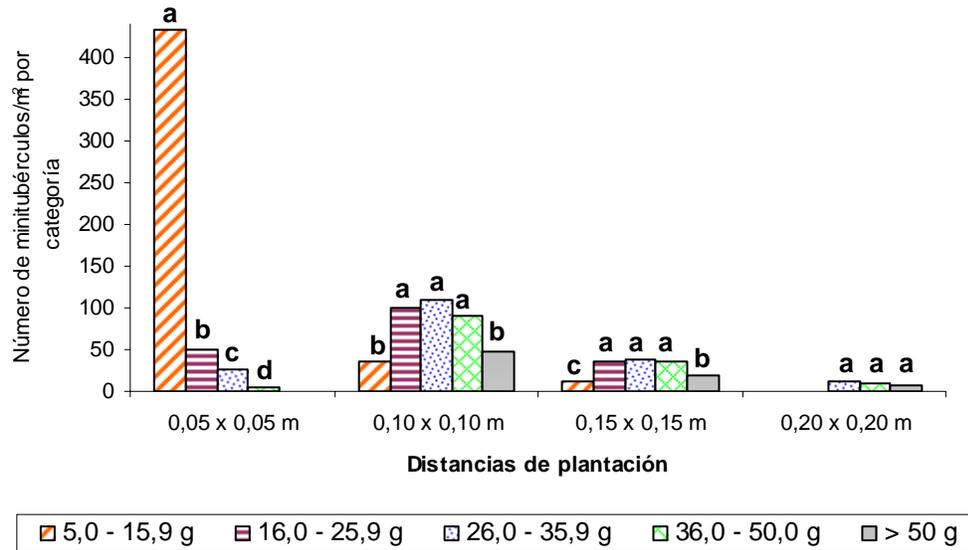
Medias con letras no comunes en las barras difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis/Mann Whitney* para $p \leq 0,05$.

Figura 2. Efecto de la distancia de plantación sobre el número de minitubérculos por metro cuadrado (m²) del clon de ñame ‘Blanco de Guinea’ a los 240 días en condiciones de umbráculo.

Factor *et al.* (2007), al estudiar la producción de minitubérculos de papa en dos sistemas hidropónicos obtuvieron entre 246,6 y 458,0 minitubérculos.m⁻²; en ese caso, las plantas *in vitro* se colocaron con un espaciamiento entre ellas de 0,15 x 0,15 m. Este resultado confirma que es posible obtener un alto número de minitubérculos a partir de plantas *in vitro* en una pequeña área.

Aunque el objetivo del presente diseño fue determinar la distancia de plantación de las plantas *in vitro* para la cual se obtiene el mayor número de minitubérculos en las cámaras de umbráculo, fue necesario clasificar los minitubérculos por su masa fresca como indicador de calidad. Según el Instructivo Técnico del cultivo del ñame

(MINAG, 2008), la masa fresca de la “semilla” de ñame a utilizar determina en gran medida la repuesta de las mismas en campo (Figura 3).



Medias con letras no comunes en las barras de una misma distancia de plantación difieren según prueba no paramétrica de *Kruskal Wallis* para $p \leq 0,05$.

Figura 3. Efecto de la distancia de plantación sobre el número de minitubérculos por metro cuadrado (m^2) en el clon de ñame ‘Blanco de Guinea’, según las categorías de masa fresca.

La distancia de plantación de las plantas *in vitro* aclimatizadas en umbráculos, no solo determinó el número de minitubérculos por m^2 , sino que influyó en el número de minitubérculos clasificados por cada categoría según la masa fresca. Cuando se empleó una distancia de plantación de 0,05 X 0,05 m, se produjeron 514 minitubérculos por m^2 y el mayor número de ellos (434) se clasificaron en la categoría de masa fresca entre 5,0 y 15,9 g para un 84,43%. Este resultado presentó

diferencias significativas respecto al número de minitubérculos clasificados en el resto de las categorías. A esta distancia no se encontró ningún minitubérculo con una masa fresca superior a 50,0 g.

En la distancia de plantación de 0,10 X 0,10 m, del número total de minitubérculos producidos por m² (383) se obtuvieron los más altos números de minitubérculos: 100, 110, 90 y 48 en las categorías con una masa fresca de: 16,0 a 25,9 g (26,10%), 26,0 a 35,9 g (28,72%), 36,0 a 50,0 g (23,49%) y más de 50,0 g (12,43%) para un 90,86% de minitubérculos con masa fresca superior a los 16,0 g, los cuales pudieron ser plantados en campo como “semilla”. En cuanto al número de minitubérculos que se obtuvo, en las tres primeras categorías no existieron diferencias significativas, pero si respecto a las otras categorías evaluadas.

Cuando se empleó una distancia de plantación de 0,15 X 0,15 m del número total de minitubérculos producidos (138), 107 de ellos (77,53%) se clasificaron en las categorías de masa fresca entre 16,0 a 25,9 g, entre 26,0 a 35,9 g y entre 36,0 a 50,0 g, además, se produjeron 20 minitubérculos con más de 50,0g. Para esta distancia de plantación, no se presentaron diferencias significativas en el número de minitubérculos entre las primeras tres categorías mencionadas, pero si con respecto al resto de las categorías.

En la distancia de plantación de 0,20 X 0,20 m se obtuvieron muy pocos minitubérculos por m² (31), pero todos ellos se clasificaron en las categorías de mayor masa fresca, superior a 26,0 g, sin diferencias significativas en el número que se formaron por cada una de ellas.

En la literatura consultada no se hallaron referencias similares en ñame, pero Sharma *et al.* (2014), al evaluar las mismas variables utilizando el cultivar de papa 'Kufri Himalini', aunque a distancias de plantación diferentes (0,30x0,10 m y 0,20x0,10 m), encontraron 237,7 minitubérculos por m² en la mayor densidad de plantas mientras que con la menor, solo obtuvieron 216,2 minitubérculos por m². Sin embargo, el rendimiento por m² fue de solo 1,96 y 2,12 kg por m².

Varios investigadores se han referido, tanto para el cultivo del ñame como para el cultivo de la papa, a la necesidad de producir minitubérculos a partir de los materiales producidos *in vitro* (plantas *in vitro* o microtubérculos) (Balogun, 2009). Esto se debe a que, hasta el presente, en la gran mayoría de los protocolos descritos para la producción de plantas *in vitro*, se obtienen plantas débiles y muy frágiles que requieren de un período de aclimatización que en ocasiones puede ser prolongado, y en la mayoría de las veces no se logran en las mismas los cambios fisiológicos necesarios que le permitan lograr una alta supervivencia y expresar sus potencialidades en las condiciones de campo (Cabrera *et al.*, 2011b).

No fue posible encontrar trabajos publicados donde se hayan efectuado clasificación de los minitubérculos por su masa fresca. En una investigación realizada por Balogun (2009) se refirió a que las plantaciones se realizaron durante varias multiplicaciones en umbráculos y solo se llevaron a campo "semillas" con similares características a la tradicionalmente plantada por los productores. Lo cual difiere del procedimiento descrito en el presente trabajo.

En el cultivo de la papa, Pérez (2001) evaluó la respuesta en campo de minitubérculos de la variedad 'Atlantic' y obtuvo 89,0% de brotación a los 15 días de

plantados en campo. Las plantas que se obtuvieron de los minitubérculos mostraron una mayor altura y número de tallos por planta en comparación con las plantas procedentes de la micropropagación. Al mismo tiempo, esas plantas presentaron valores superiores en cuanto al peso y diámetro de los tubérculos producidos. Los resultados del presente trabajo en cuanto a la evaluación de la brotación de los minitubérculos de ñame son comparables con los obtenidos por este investigador en el cultivo de la papa.

Según Cabrera *et al.* (2010), durante la evaluación en campo de microtubérculos del ñame (*Dioscorea alata* L.) formados mediante Sistemas de Inmersión Temporal, en comparación con plantas *in vitro* y tubérculos convencionales, permitieron identificar que el factor masa fresca fue determinante para el establecimiento de las plántulas: aquellas con un peso de 3,0 g o más alcanzaron un 91,30% de brotación y un 96,50% de supervivencia. También Behera *et al.* (2009) encontraron un 90% de supervivencia de ese tipo de plántulas en campo.

En Cuba la experiencia práctica con este tipo de plantas de ñame en condiciones de producción es escasa y está poco documentada. Por ejemplo, en la Biofábrica de la provincia de Granma se produjeron en el año 2011 más de 100 mil plantas *in vitro* de ñame 'Blanco de Guinea' de las cuales, en fase de aclimatización se logró un 85% de supervivencia y al llevarlas a campo las pérdidas superaron el 90%. Este resultado se debió, probablemente, a las dificultades de las plantas para adaptarse a un entorno hostil de altas temperaturas y la fuerte incidencia del sol durante los primeros días en campo (Destral, 2013; comunicación personal).

Aunque se determinó el efecto de la distancia de plantación de las plantas *in vitro* en las cámaras de umbráculos sobre la producción de minitubérculos y se obtuvo el mayor número de ellos a una distancia de plantación de 0,05 X 0,05 m, es necesario evaluar la repuesta en campo de los minitubérculos clasificados por categoría según su masa fresca para determinar cuál distancia de plantación es la más recomendable a emplear en los umbráculos (Figura 4).



Figura 4. Minitubérculos de ñame 'Blanco de Guinea' producidos en cámaras de umbráculos a partir de plantas *in vitro* previamente aclimatizadas, a los 240 días en condiciones de umbráculo.

Estos resultados tienen valor práctico porque demuestran que es posible obtener minitubérculos del ñame 'Blanco de Guinea' a partir de plantas *in vitro*, en una pequeña área bajo condiciones semicontroladas y durante una etapa previa a la óptima de siembra del cultivo, para luego llevarlos directamente a campo como material de plantación.

4.2. Respuesta en campo de los minitubérculos

La masa fresca de los minitubérculos influyó en su brotación y luego en la supervivencia de las plantas en condiciones de campo (Tabla 2). Cuando se plantaron directo a campo minitubérculos con una masa fresca en las categorías: de 26,0 a 35,9 g, de 36,0 a 50,0 g y superiores a 50,0 g se obtuvieron los más altos porcentajes de brotación a las cuatro semanas de cultivo en campo, sin diferencias significativas entre ellas y sí con los minitubérculos de 16,0 - 25,9 g.

Tabla 2. Efecto de la masa fresca de los minitubérculos del ñame ‘Blanco de Guinea’, sobre el porcentaje de brotación y la supervivencia de las plantas en campo.

Masa fresca (g MF)	Brotación		Supervivencia	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
Minitubérculos (16– 25,9)	91	334 b	96	189 a
Minitubérculos (26– 35,9)	98	412 a	96	211 a
Minitubérculos (36– 50,0)	97	416 a	98	214 a
Minitubérculos (> 50,0)	98	122 a	98	223 a
Plantas <i>in vitro</i>	-	-	67	82 b

Rangos medios con letras no comunes difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall*

Wallis para $p < 0,05$

La supervivencia de las plantas a las seis semanas de cultivo en campo también estuvo influenciada por el tipo de material vegetal de plantación y por la masa fresca

de los minitubérculos. Los más altos porcentajes de supervivencia se alcanzaron en las plantas provenientes de los minitubérculos en comparación con las plantas *in vitro*, con diferencias significativas entre ellas. No obstante, los minitubérculos en la categoría de 16,0 - 25,9 g, también mostraron buenos porcentajes de brotación y supervivencia.

El resultado en cuanto al más alto porcentaje de supervivencia de las plantas procedentes de los minitubérculos, con una masa fresca superior a 26,0 g, pudiera deberse a que, según Ijoyah *et al.* (2006), este proceso y el posterior crecimiento de los brotes hasta que las plantas comienzan a realizar fotosíntesis depende de la acumulación de las sustancias de reservas del material vegetal de plantación.

La ruptura del período de dormancia en ñame, que determina el porcentaje de brotación, está influenciada por varios factores, uno de ellos es el fotoperíodo. Ondo *et al.* (2009) informaron que existía una correspondencia entre el fotoperíodo más corto y el mayor período de dormancia; sin embargo, Olivier *et al.* (2012) encontraron lo contrario: a menor fotoperíodo la germinación fue más rápida. Obviamente es una situación que amerita nuevos estudios fisiológicos que permitan dilucidar o confirmar el efecto del fotoperíodo sobre la dormancia en este cultivo.

El proceso de formación de minitubérculos en ñame ha sido muy poco estudiado y no fue posible encontrar trabajos publicados donde se hubiese evaluado su producción por categorías de masa fresca en umbráculos, a partir de plantas *in vitro* y aclimatizadas. Por tales razones, estos resultados son novedosos para el desarrollo del cultivo del ñame a partir de la utilización de la biotecnología. No obstante, Ondo *et al.* (2010a, b) informaron sobre la obtención de microtubérculos (en condiciones *in*

vitro) en un cultivar de *D. rotundata* Poir, los cuáles fueron utilizados para la plantación en campo sin dificultades. Destacan estos autores que hallaron una relación directa entre el tamaño de los microtubérculos y la brotación: los microtubérculos más grandes, brotaron primero.

Por otra parte Naik y Karihaloo (2007) señalaron que el tamaño, masa fresca y la edad fisiológica de los minitubérculos de papa destinados para la plantación directa en campo, determinan el momento de la ruptura del período de dormancia y la brotación. El tamaño y masa fresca de los minitubérculos están determinados en gran medida por el contenido de sustancias de reserva, dentro de las cuales se encuentra el almidón, el cual es movilizado durante la brotación para ser utilizado en el posterior crecimiento y desarrollo de los brotes (Claassens y Vreugdenhil, 2000; Olivier *et al.*, 2012). Ellos han presentado innumerables ventajas en comparación con la plantación directa de plantas *in vitro* las cuales son frágiles y débiles (Özkaynak y Samaci, 2005).

El tipo de material vegetal de plantación (minitubérculos y plantas *in vitro*) y la masa fresca de los minitubérculos no influyeron en el número de tubérculos por planta a las 36 semanas de cultivo en campo (Tabla 3), pues no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ellos. Sin embargo, la masa fresca de los tubérculos por planta estuvo influenciada por el tipo de material vegetal de plantación. Se obtuvieron los mejores resultados al utilizar los minitubérculos en comparación con las plantas *in vitro*.

Con los minitubérculos de masa fresca superior a 26,0 g, se lograron las mejores respuestas, sin diferencias significativas respecto al resto de los minitubérculos

clasificados por categoría con una masa fresca superior a ésta. Los minitubérculos de masa fresca entre 26,0 y 35,9 g tampoco presentaron diferencias significativas, en cuanto a la masa fresca de los tubérculos por planta, en relación a los de la categoría entre 16,0 y 25,9 g.

Tabla 3. Efecto de la masa fresca de los minitubérculos del clon de ñame ‘Blanco de Guinea’ a las 36 semanas de cultivo en campo.

Masa fresca (g MF)	Número de tubérculos/planta		Masa fresca de los tubérculos/planta (kg)	
	Media	Rangos medios	Media	Rangos medios
Minitubérculos (16,0– 25,9)	2,67	62,34 a	3,34	48,67 b
Minitubérculos (26,0– 35,9)	2,88	61,78 a	3,67	51,45 ab
Minitubérculos (36,0– 50,0)	2,64	60,56 a	3,90	55,70 a
Minitubérculos (> 50,0)	2,56	51,14 a	4,13	56,89 a
Plantas <i>in vitro</i> (control)	2,45	63,22 a	2,45	36,45 c

Rangos medios con letras no comunes difieren según prueba no paramétrica de *Kruskall*

Wallis/Mann Whitney para $p \leq 0,05$.

La respuesta que se obtuvo en las plantas procedentes de los minitubérculos de ñame con una masa fresca superior a 26,0 g, la cual es inferior a la descrita en el Instructivo Técnico del cultivo del ñame (MINAG, 2008) en comparación con las plantas *in vitro* previamente aclimatizadas, se debió a que al provenir estas plantas

de un material vegetal con mayor acumulación de sustancias de reservas, estas emergieron con mayor rapidez y uniformidad, y desarrollaron más rápido el follaje. Un mayor desarrollo de follaje le permite a las plantas interceptar más radiación solar, realizar más fotosíntesis y sintetizar mayor cantidad de carbohidratos, lo que unido a la absorción de las sustancias minerales por las raíces, repercute en el desarrollo del cultivo (Bonilla, 2001).

Los minitubérculos han sido considerados como un material vegetal de plantación ideal para iniciar programas de producción de “semillas” de alta calidad (Chen *et al.*, 2007). Según Carrasco *et al.* (2008), mientras más minitubérculos se produzcan por planta, la producción de “semilla” base será más efectiva, ya que se necesitará un menor número de años de multiplicación en campo hasta lograr la suficiente cantidad de “semilla” y a su vez, la incidencia de enfermedades será también menor al estar un número inferior de años expuesta a los patógenos y enfermedades en campo. Por tanto, el procedimiento evaluado en este trabajo permitirá reducir las áreas dedicadas a la producción de “semilla”, con el consiguiente ahorro de recursos, la disminución de los costos, y una mayor eficiencia en el proceso productivo.

Los resultados de la presente investigación para el cultivo del ñame garantizan insertar la metodología desarrollada para producir minitubérculos como parte del esquema nacional de producción de “semilla” básica de ñame en Cuba, específicamente del clon ‘Blanco de Guinea’, que no produce bulbillos aéreos (también utilizados como material de plantación) y evitar las pérdidas que se producen en condiciones de campo cuando se trasplantan directamente plantas *in vitro*, previamente aclimatizadas.

El 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, siendo difícil separar las tres causas. Por lo cual constituyen el material de plantación ideal para iniciar los programas de producción de semilla en cualquier cultivo de propagación vegetativa.

Finalmente, se puede plantear que en un cultivo de reproducción asexual como el ñame, donde el material vegetal de plantación envejece fisiológicamente por las reiteradas multiplicaciones en campo y se deteriora por la acumulación de microorganismos y otros factores adversos, 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. Estos aspectos validan la aplicación práctica de los resultados de la presente investigación.

4.2.1. Influencia del número de minitubérculos por montículo sobre la producción de “semilla”

Al plantar tres minitubérculos por montículo se obtuvo el mayor número de tubérculos y el mayor peso total de los tubérculos, con diferencias significativas con el resto de los tratamientos estudiados (Tabla 4). Este resultado garantiza una mayor producción de “semilla” por área, pues se dispondría de mayor cantidad de tubérculos para utilizar con ese fin. Incluso, en dependencia del tamaño y el peso, podrían fraccionarse e incrementar la cantidad de material vegetal de plantación.

Tabla 4. Efecto del número de minitubérculos por montículo en la producción de “semilla” del clon de ñame ‘Blanco de Guinea’ en campo.

Número de minitubérculos/montículo	Número de tubérculos	Rangos medios	Peso de tubérculos (Kg)	Rangos medios
1	2,80	21,80 c	4,90	18,70 c
2	3,90	30,30 b	6,07	30,00 b
3	5,10	39,40 a	7,30	42,80 a
4	2,95	23,42 c	4,50	17,21 d
“semilla” convencional (control)	2,03	18,23 d	4,97	19,78 c

Rangos medios con letras desiguales difieren para $p \leq 0.05$ según prueba de *Kruskal Wallis/Mann Whitney*.

En el caso de cuatro minitubérculos por montículo se obtienen resultados inferiores, lo cual puede deberse a la competencia por el área vital. Según Cayón (1992) la alta densidad en los cultivos ejerce una gran influencia sobre el crecimiento y desarrollo de cada planta debido a la competencia por la luz y los nutrientes.

La producción de minitubérculos en ñame ha sido muy poco abordado desde el punto de vista investigativo (Olivier *et al.*, 2012), a diferencia de otros cultivos como la papa, donde sí existen muchas investigaciones relacionadas con ese tema. En consecuencia, existen pocas referencias en la literatura consultada, relacionados con estos aspectos de obtención y manejo de los minitubérculos de ñame como alternativa en la producción de “semilla” en este cultivo. Tampoco fue posible

encontrar información sobre el uso de más de una “semilla” (convencional o de minitubérculos) por montículo para tomar como referencia en este estudio, por lo que este es un aporte novedoso de este trabajo.

Sin embargo, las siembras en alta densidad se han estudiado en otros cultivos de importancia económica con resultados muy favorables. En el caso de los cultivos permanentes, estos sistemas presentan una serie de ventajas de manejo agronómico que contribuyen a elevar la producción, hacer un uso más apropiado de la tierra y lograr mayor rentabilidad de las plantaciones (Martínez 2006). Otro aspecto de esas tecnologías, es que también se obtienen altos volúmenes de ‘semilla’ para plantar nuevas áreas (Álvarez, 2011).

En el caso de la papa, según Wirsema (1987) la densidad de tallos afecta el número de tubérculos, el tamaño de los tubérculos y la tasa de multiplicación; la densidad recomendada de tallos depende del ambiente, propósito del cultivo y de la variedad de papa. El número de tubérculos producidos depende de la competencia entre los tallos por los factores de crecimiento, coma nutrientes, agua y luz. De otro lado, cuando aumenta la densidad de tallos, disminuye el número de tubérculos por tallo, pero aumenta, generalmente, el número de tubérculos por unidad de área. En papa, como sucede en el ñame, en la producción de semilla certificada se le da prioridad a los tubérculos pequeños (Wirsema, 1987).

En el caso del boniato (*I. batatas* L.), se han utilizado alternativas incrementando la cantidad de esquejes por área, lo cual ha permitido un aumento de la cantidad de “semilla” por unidad de área, con una repercusión positiva en la reducción de los costos y la obtención de mayores ingresos por concepto de ventas (Díaz, 2012).

En un programa eficiente para producir “semilla” en cultivos de propagación agámica como el ñame, y en especial, en clones como ‘Blanco de Guinea’ que no produce bulbillos aéreos, es esencial utilizar las técnicas de micropropagación para incrementar el material vegetal de plantación. Por tales razones, los resultados de esta investigación son novedosos para este cultivo y además, tienen aplicación práctica en el esquema de producción de “semilla” de ñame en Cuba.

A partir de estos resultados fue posible establecer una estrategia para la producción de minitubérculos del clon de ñame ‘Blanco de Guinea’ a partir de plantas *in vitro* en cámaras de umbráculo, la cual ha resultado de gran utilidad en la toma de decisiones por los especialistas de producción de las Biofábricas para producir material de plantación de alta calidad.



5. CONCLUSIONES

1. Con la distancia de plantación de 0,10 x 0,10m se logró el mayor número de minitubérculos (248) por metro cuadrado con una masa fresca superior a 26,0 g en el clon de ñame 'Blanco de Guinea', los cuales pueden ser utilizados como material de plantación directo a campo.
2. Fue posible con la siembra de tres minitubérculos por montículo lograr una alta producción de tubérculos para "semilla" en campo.

6. RECOMENDACIONES

1. Aplicar la estrategia desarrollada para la producción de material vegetal de plantación del clon de ñame 'Blanco de Guinea' (*Dioscorea rotundata* Poir.), a partir de plantas *in vitro*.
2. Evaluar las posibilidades de aplicación de los resultados de esta investigación en otros clones de interés, como parte de la estrategia de producción de "semilla" de ñame en Cuba.



7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA I, SHIWASHI H, ASIEDU R & AKORODA MO. (2004). Effect of auxins on root development in yam (*Dioscorea rotundata*) vine. *Tropical Science* 44(2): 113-119.
- AHMED F & UROOJ A. (2008). *In vitro* starch digestibility characteristics of *Dioscorea alata* tuber. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 3 (2): 29-33.
- ALVAREZ JM. (2011). Una nueva concepción en la producción de plátano en Cuba. Revista Institucional del Grupo Empresarial de Producciones Biofarmacéuticas y Químicas (LABIOFAM), 1/2011. Disponible en: <http://revistas.labiofamcuba.com/articulo/una-nueva-concepcion-en-la-produccion-de-platano-en-cuba.html>, Consultado 4/03/2015.
- AMUSA N, ADEGBITE A, AMUHAMMEDA S & BAIYEWU RA. (2003). Yam diseases and its management in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 2(12): 497-502.
- ANDRIOLO JL, BISOGNIN DA, GODOI RS, BORTOLOTTO OC, COGO CM & MADALÓZ JCC. (2005). Produtividade de tubérculos semente de batata em cultivo hidropônico com dois substratos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE OLERICULTURA, 45. *Resumos*. Goiânia: SOB (CD-ROM).
- ASIEDU R, MIGNOUNA H, ODU B, HUGHES J. (2003). Yam breeding. p. 466-475. In: Plant virology in sub-Saharan Africa. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), Ibadan. Nigeria. 583 p.
- AZCON-BIETO J. & TALON M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. 2da edición. Mc Graw-Hill. New York, NY. 639 p.
- 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* 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. 156 p.



- BALOGUN MO. (2009). Microtubers in yam germplasm conservation and propagation: The status, the prospects and the constraints. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 4(1): 1-10.
- BEHERA K K, SAHOO S & PRUSTI A. (2009). Regeneration of Plantlet of Water Yam (*Dioscorea oppositifolia* L.) through in vitro Culture from Nodal Segments. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 37(1): 94-102.
- BONILLA I. (2001). Introducción a la nutrición mineral de las plantas. Los elementos minerales. En: Azcon-Bieto J Y Talon M. (Ed). Fundamentos de fisiología vegetal. pp. 113-131.
- 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>
- CABRERA M, GÓMEZ, R & RAYAS A. (2010). Evaluación en campo de plantas de ñame (*Dioscorea alata* L.) obtenidas de microtubérculos formados en Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología* 12(1):47-56.
- CABRERA M, GÓMEZ R & ESPINOSA E. (2011a). Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. 'Pacala Duclos'). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15: 515–521.
- CABRERA M, SANTOS A, BASAIL M, LÓPEZ J, RAYAS A & MEDERO V. (2011b). Field performance of yam microtuber from temporary immersion system. *African Journal of Biotechnology* 10(46): 9268-9271.
- CABRERA M, GOMEZ R & ESPINOSA E. (2012). Efficiency of semi-automated culture systems on microtuber formation of yam (*Dioscorea alata* L.). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(1): 45–47.



- CALVA G, & PÉREZ J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: la fuente de alimentos del futuro. *Revista Digital Universitaria*. 6(11): 1-16. Consultada: 25 abril del 2012. http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf.
- CARRASCO A, RIGA P & RUIZ JI. (2004). Ventajas de la producción a escala comercial de minitubérculos de patata mediante aeroponía. CAPÍTULO 2. TÉCNICAS DE CULTIVO, *Actas de Horticultura* 58:79-82.
- CAYÓN G. (1992). Fotosíntesis y productividad de cultivos. *Revista Comalfi* 19(2):23-21.
- 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.
- CHO J, CHOI H, LEE J, KIM M, SOHN H & GUN D. (2013). The antifungal activity and membrane-disruptive action of dioscin extracted from *Dioscorea nipponica*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1828 (3):1153-1158.
- CHOI E, KOO S & HWANG J. (2004). Immune cell stimulating activity of mucopolysaccharide isolated from yam (*Dioscorea batatas*). *Journal of Ethnopharmacology* 91:1-6.
- CLAASSENS MM & VREUGDENHIL J. (2000). Is dormancy breaking of potato tubers the reverse of tuber initiation?. *Potato Research* 43: 347-369.
- DEEPIKA V, JAYARAM K & ANIMA P. (2013). Isolation and physicochemical characterization of sustained releasing starches from *Dioscorea* of Jharkhand. *International Journal of Biological Macromolecules* 55:193-200.
- DÍAZ R. (2012). Nueva tecnología de producción de semilla agámica en el boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam). Tesis presentada en opción al título académico de Master en Agricultura Sostenible. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, 71 p.
- DONNELLY J, COLEMAN DKW & COLEMAN S. (2003). Potato microtuber production and performance: A Review. *Amer J of Potato Res* 80: 103-115.



- DOS SANTOS CB, REZENDE PC, ALVARENGA M, PUIATTI M, PRIETO HE & FONTES R. (2012). Production of basic potato seed minitubers in substrate and different nitrogen rates, *Rev. Ceres* 59(6): 850-858.
- ENGELMANN F. (2011). Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 47: 5–16.
- FACTOR TL, ARAUJO J, KAWAKAMI F & IUNCK V. (2007). Produção de minitubérculos básicos de batata em três sistemas hidropônicos. *Hortic. Bras.* 25(1): 82-87.
- FAO. (2010). Tratado internacional sobre los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura. Consulta: 06 Junio del 2012. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0510s/i0510s.pdf>
- FAOSTAT. (2015). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Dirección de Estadística. En <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/S>, consultado. 11 Marzo 2015.
- FAVORETTO P. (2005). *Parâmetros de crescimento e marcha de absorção de nutrientes na produção de minitubérculos de batata cv. Atlantic*. Piracicaba. (Tesis de Maestría) Universidad Federal de Sao Paulo – ESALQ. 98p.
- FILIPPIA R & PINO ALGORA JA. (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.
- FU S, HSU Y, LEE P, HOU W, HUNG L, CHI L, CHEN C & HUANG Y. (2006). Dioscorin isolated from *Dioscorea alata* activates TLR4-signaling pathways and induces cytokine expression in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 339:137–144.
- 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. *Bioteología Vegetal* 4(4):184-187.



- GONG G, QIN Y & HUANG W. (2011). Anti-thrombosis effect of diosgenin extract from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright *in vitro* and *in vivo*. *Phytomedicine* 18: 458–463.
- GONZÁLEZ JE. (2006). Diagnóstico de enfermedades virales pertenecientes al género de los Potivirus en los genotipos 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.
- HAN C, LIU J, FANG S & HOU W. (2013). Antioxidant activities of the synthesized thiol-contained peptides derived from computeraided pepsin hydrolysis of yam tuber storage protein, dioscorin. *Food Chemistry* 138: 923-930.
- HERNÁNDEZ A, PÉREZ J M & BOSCH ID. (1999). Nueva versión de la clasificación genética de los suelos de Cuba. Instituto de Suelos. AGROINFOR, Ciudad de la Habana. 64p.
- HU K & YAO X. (2002). The cytotoxicity of protoneodioscin (NSC-698789), a furostanol saponin from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cells *in vitro*. *Phytomedicine* 9:560-565.
- 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* 5(22): 2086-2091.
- INIVIT. (2012). Instructivo Técnico para la producción de semillas de Viandas. FAO. (Ed.), Ciudad de La Habana, Cuba, 162 p.
- IPGRI/IITA. (1997). Descriptores para el ñame (*Dioscorea* spp.). Instituto Internacional del Agricultura Tropical, Ibadán, Nigeria/ Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.
- 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.
- JIANG Q, GAO W, SHI Y, WANG H, HUANG L & XIAO P. (2013). Physicochemical properties and *in vitro* digestion of starches from different *Dioscorea* plants. *Food Hydrocolloids* 32(2): 432 – 439.
- JIMÉNEZ F, AGRAMONTE D, PÉREZ M, LEÓN M, RODRÍGUEZ M & ALVARADO Y. (2010). Producción de minitubérculos de papa var. 'Desirée' en casa de cultivo con sustrato zeolita a partir de plantas cultivadas *in vitro*. *Bioteología Vegetal* 10(4): 219-228.
- JIN M, SUH S, YANG J, LU Y, KIM S, KNOE S, HYUNG T, KIM J, PARK Y, AHH G, LEE C, KIM C, SON J, SON K & CHANG H. (2010). Anti-inflammatory activity of bark of *Dioscorea batatas* Decne through the inhibition of iNOS and COX-2 expressions in RAW264.7 cells via NF- κ B and ERK1/2 inactivation. *Food and Chemical Toxicology* 48:3073–307.
- 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* 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 Y 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.
- 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.
- LI H, HUANG W, WEN Y, GONG G, ZHAO Q & YU G. (2010). Anti-thrombotic activity and chemical characterization of steroidal saponins from *Dioscorea zingiberensis* C.H. Wright. *Fitoterapia* 81:1147–115.
- LI M, LI J, LIU W, LIU L, LU J, NIU J, LIU X & YANG Q. (2014). A protocol for in vitro production of microtubers in Chinese yam (*Dioscorea opposita*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 78(6): 1005-1009.
- LOWELL L, DILWORTH F, OMORUYI P Y HELEN N. (2007). *In vitro* availability of some essential minerals in commonly eaten processed and unprocessed Caribbean tuber crops. *Biometals* 20 (1): 37-42.
- LU C, NAN K & JIAO M. (2009). Inhibition of cellular proliferation and induction of apoptosis in human esophageal carcinoma cell lines by extracts of *Dioscorea bulbifera* L and *Chinese angelica*. *Journal of Nanjing Medical University* 23(6):398-402.
- 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.
- MALDONADO C C. (1996). Minitubérculos y mejores papas. *El Surco*. 101(3):7-8.
- MARTÍNEZ G. (2006). Situación actual de los sistemas de producción de musáceas en Venezuela. En: Memorias del IX Congreso Venezolano de Fruticultura, Barquisimeto 24-27 de octubre, p: 99-108.
- MBAH EI & WAKIL SM. (2012). Elimination of bacteria from *in vitro* yam tissue cultures using antibiotics. *J Plant Pathol*. 94(1): 53-58.
- MEDERO V, GARCÍA M, VENTURA J, RODRÍGUEZ S, GARCÍA J, MARTÍNEZ M, BAUTA M & ÁLVAREZ M. (1997). Uso del sistema de inmersión temporal en yuca (*Manihot Esculenta*, Crantz) y Malanga (*Xanthosoma Violaceum*). *Agrotécnia de Cuba* 27 (3): 2-6.



- MEDERO V, DEL SOL L & GARCÍA M. (1999). Metodología para la propagación del clon de ñame 'Blanco o Pelú'. Resúmenes de BioCat'99, Granma, Cuba, 5-7 de Octubre (1999), pp. 12.
- 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* 12(1): 20-28.
- MINAG, 2008).**
- 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.
- MUTHONI J, MBIYU MW & NYAMONGO DO (2010). A review of potato seed systems and germplasm conservation in Kenya. *J. Agric. Food Info.*, 11:157–167.
- MUTHONI J, MBIYU M & KABIRA JN. (2011). Up-scaling production of certified potato seed tubers in Kenya: Potential of aeroponics technology. *Journal of Horticulture and Forestry*, 3(8): 238-243.
- 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 & 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.
- OLIVIER KA, KONAN KN, ANIKE FN, AGBO GN & DOBO HW. (2012). *In vitro* induction of minitubers in yam (*Dioscorea cayenensis*- *D. rotundata* complex) *Plant Cell Tiss Organ Cult* 109:179–189.



- ONDO P, KEVERS C, & DOMMES OJ. (2009). Effect of reducing concentration on *in vitro* formation and sprouting in yam (*Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex). *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 99: 55-59.
- ONDO P, KEVERS C & DOMMES J. (2010a). Effects of storage conditions on sprouting of microtubers of yam (*Dioscorea cayenensis* –*D. rotundata* complex). *Comptes Rendus Biologies*, 333(1): 28-34.
- ONDO P, KEVERS C & DOMMES OJ. (2010b). *In Vitro* Preservation of Yam (*Dioscorea cayenensis* – *D. rotundata* complex) for a Better Use of Genetic Resources, *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 38 (2): 141-146.
- ÖZKAYNAK E & Ondo SAMANCI B. (2005). Yield and yield components of greenhouse, field and seed bed grown potato (*Solanum tuberosum* L.) plantlets. *Akdeniz Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi* 18 (1): 125-129.
- PACHECO-DELAHAYE E, TECHEIRA N. & GARCÍA A. (2008). Elaboración y evaluación de polvos para bebidas instantáneas a base de harina extrudida de ñame (*Dioscorea alata*). *Revista Chilena de Nutrición* 35(4): 452-459.
- PAGLIANO D. (2004). El papel de las nuevas biotecnologías en la producción agropecuaria. En: Echenique V, Rubinstein C Y Mroginski L. (Ed). *Biología y Mejoramiento Vegetal*. pp. 21-33.
- 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.
- PÉREZ N, DE FERIA M, JIMÉNEZ E, CAPOTE A, QUIALA E. (1999). Producción de microtubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L) en sistemas de inmersión temporal y estudio de su comportamiento en campo. IBP-UCLV, Santa Clara, Cuba.
- PÉREZ J, ALBERT D, ROSETE S, SOTOLONGO L, FERNÁNDEZ M, DELPRETE P & RAZ L. (2005). Consideraciones botánicas sobre el género *Dioscorea* (Dioscoreaceae) en Cuba. *Ecosistemas* 14 (2): 142-149.



- 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.
- POLZIN F, SYLVESTRE I, DÉCHAMP E, ILBERT P, ETIENNE H & ENGELMANN F. (2014). Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 50(2):210-216.
- PRIMITIVA, L., NAMUR, J. J., BOLLATI, S. A. & ANTONIO, O. E. (2010). Aclimatación de *Phanelopsis* y *Cattleya* obtenida por micropropagación. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 12(2):27-40.
- RAYAS A, CABRERA M, GUTIÉRREZ V, GARCÍA M, LÓPEZ J, RODRÍGUEZ S, MILIÁN M, MEDERO V, BASAIL M, SANTOS A, TORRES Y, BAUTA M, TOLEDO H. (2008). Efecto del manitol sobre la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata*. XI Encuentro de Botánica "Johannes Bisse *In Memoriam*". 14 al 17 de noviembre/2008. CD memorias, ISBN. 978-959-18-0395-5.
- 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, S. (2010). Generación y transferencia de tecnología: una de las claves para la transformación de la agricultura cubana. *Revista Cubana de Gestión Empresarial. Nueva Empresa*, 6(2): 5-8.



- RODRÍGUEZ, D. (2012). Producción de material vegetal de ñame (*Dioscorea rotundata* Poir.) a partir de plantas *in vitro*, para plantar. Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas, 47 p.
- 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 DÍAZ R & HOYOS SÁNCHEZ RA. (2007). Multiplication and *in vitro* tuberization of yam (*Dioscorea alata* L.) in temporary immersion system. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 60: 3907–3921.
- SALAZAR RD & BELTRAN JDH. (2003). Microtuberización en ñame (*Dioscorea alata* L.) var. 'Pico de botella'. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4(2): 27-32.
- 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).
- SHARMA AK & PANDEY KK. (2013). Potato mini-tuber production through direct transplanting of *in vitro* plantlets in green or screen houses – a review. *Potato J.* 40 (2): 95-103.
- SHARMA AK, VENKATASALAM EP & KUMAR V. (2013). Potato mini-tuber production during main and off crop seasons in high hills of north-western Himalaya. *Potato J.* 40(1): 29-37.



- SHARMA AK, KUMAR V & VENKATASALAM EP. (2014). Effect of method of planting and plantlet density on potato mini-tuber production. *Potato J.* 41(1): 52-57.
- STRUIK PC. (2007). The Canon of Potato Science: Minitubers. *Potato Res* 50: 305-08.
- 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.
- TEJEDA L, TEJEDA C, VILLABONA A, TARON A, BARRIOS R & MALENA L. (2007). Aprovechamiento del ñame espinoso (*Dioscorea rotundata*) en la producción de bioplásticos. *Prospectiva Universidad Autóctona del Caribe* 6(1): 68-74.
- VAILLANT V, BADE P & CONSTANT C. (2005). Photoperiod affects the growth and development of yam plantlets obtained by *in vitro* propagation. *Biol. Plant*, 49:355-359.
- WAIZEL-BUCAY J. (2009). El uso tradicional de las especies de *Dioscorea*. *Revista de Fitoterapia* 1:53-67.
- WIERSEMA SG, CABELLO R, TOVAR P & DODDS JH. (1987). Rapid seed multiplication by planting into beds micro-tubers and *in vitro* plants. *Potato Res* 30(1): 117-20.
- WIERSEMA SG (1987) Efecto de la densidad de tallos en la producción de papa. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, 1987. CIP (ed) Tercera edición, revisada. Boletín de Información Técnica, 116 p.
- WILSON JE. (1989). Rapid multiplication of yams (*Dioscorea* spp.). Institute for Research, Extension and Training in Agriculture. *IRETA Publication* No. 3/88. 11p.
- YAN H, YANG L & LI Y. (2011). Improved growth and quality of *Dioscorea fordii* Prain et Burk and *Dioscorea alata* plantlets using a temporary immersion system. *Afr. J. Biotech.* 10: 19444 – 19448.



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.