

MICROPROPAGACIÓN Y ORGANOGÉNESIS DE

Dioscorea alata (ÑAME)

Marilyn Royero, Teresa Edith Vargas y Maira Oropeza

RESUMEN

Para establecer una metodología eficiente para la propagación *in vitro* del ñame (*Dioscorea alata*) se obtuvieron plantas a partir de tubérculos en condiciones de vivero. Para micropropagación se extrajeron segmentos de tallo de 1cm de largo con un nudo y 1-2 yemas laterales; para organogénesis se utilizaron las plantas obtenidas por micropropagación, de las cuales se escindieron segmentos de microesquejes. Los explantes fueron cultivados en medio Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementado con diferentes combinaciones hormonales. Para la micropropagación se utilizaron medios constituidos solo con las sales MS completas o reducidas a 1/5, y tres medios suplementados con hormonas vegetales, obteniéndose un promedio de 4,90 brotes por explante en el medio suplementado con 0,5mg·l⁻¹ BA. En la multiplicación masiva, el medio de cultivo fue suplementado con 2mg·l⁻¹ BA y se obtuvo un

promedio de 5,75 plantas por explante, a los 90 días de cultivo. Para la inducción de organogénesis directa se utilizó MS suplementado con 1mg·l⁻¹ BA + 0,5mg·l⁻¹ ANA. Tras 105 días de cultivo se observó un promedio de 25,15 brotes por explante. El 10% de los microesquejes cultivados presentaban formación de callo y la regeneración de 5,3 brotes por fragmento de callo de ~1cm². La regeneración de *D. alata* por micropropagación se obtiene después de 4,5 meses de cultivo, mientras que por organogénesis se obtiene a los 6 meses, pero con mayor número promedio de brotes por explante. En ambos sistemas, el enraizamiento se logró en el mismo medio usado para el establecimiento del proceso. Las plantas regeneradas a partir de estos sistemas se aclimataron en sustratos de tierra negra abonada y arena lavada (1:1) con eficiencia de 70,7% de plantas aclimatadas.

SUMMARY

To establish an efficient *in vitro* regeneration system for *D. alata* plants, yam tubers were potted in a mixture of soil and organic humus in greenhouse conditions. For micropropagation 1cm long stem sections with 1-2 lateral buds were obtained from these plants. For organogenesis, micropropagated plants were used as sources of explants (microcuttings). Explants were cultured on Murashige and Skoog (1962) media (MS) supplemented with different hormonal combinations. For micropropagation, MS and 1/5 MS were used as control media. Three more media with hormones were also used for micropropagation. After 45 days, 4.9 buds per explant were obtained on MS supplemented with 0.5mg·l⁻¹ BA. Mass multiplication was achieved in MS supplemented with 2mg·l⁻¹ BA. After 90 days an average of 5.75 plants

per explant was obtained. MS supplemented with 1mg·l⁻¹ BA + 0.5mg·l⁻¹ ANA was used for the establishment of organogenesis. After 105 days, an average of 25.15 buds per explant was obtained (direct organogenesis). Callus tissue production was observed on 10% of microcutting explants cultured on the same medium with an average of 5.3 buds per 1cm² callus fragment (indirect organogenesis). Micropropagated *D. alata* plants were obtained after 4.5 months of culture; while plants originated through direct organogenesis took 6 months to reach maturity; however, they produce a higher number of buds per explant. *D. alata* plants regenerated through micropropagation and organogenesis processes were potted with soil and river sand (1:1) and 70.7% plant acclimatization was obtained.

Introducción

El género *Dioscorea* (Monocotiledónea) pertenece a la familia Dioscoreaceae y comprende de 600 a 850 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Los cultivos tuberosos de *Dioscorea* se conocen como ñames y proveen una fuente importante de alimento en estas regiones donde también es aprovechado

en el campo de la medicina y farmacología, por su considerable contenido de diosgenina. Aunque la producción de ñame es solo 1/10 de la de yuca y batata, la mayoría de los ñames son cultivados y consumidos localmente; por lo tanto, cualquier mejoramiento en esta especie es importante para incentivar la agricultura sostenible en estas regiones.

La propagación de este cultivo por semilla sexual pre-

senta dificultades ya que son plantas dioicas y con flores pequeñas (Acosta, 1987). Debido a su alta heterocigosidad, los cultivos y clones élite son propagados vegetativamente (Kadota y Niimi, 2004). Para esto, se emplea segmentos de tallos, bulbillos axilares llamados "gundas" y tubérculos enteros o segmentos de los mismos. Las tasas de multiplicación vegetativa son muy bajas y este sistema constituye

un medio de transmisión de plagas y enfermedades.

El establecimiento de una metodología eficaz para la propagación *in vitro* del ñame tiene gran importancia en diferentes áreas de la agricultura, ya que permite la producción de plantas libres de patógenos, rápida multiplicación, producción de semilla de alta calidad y conservación de germoplasma (Cabrera *et al.*, 2003). Borges *et al.* (2004) compararon

PALABRAS CLAVE / *Dioscorea alata* / Micropropagación / Organogénesis /

Recibido: 19/05/2006. Modificado: 29/01/2007. Aceptado: 30/01/2007.

Marilyn Royero. Licenciada en Biología, Universidad Central de Venezuela (UCV). Investigadora, Proyecto BID-FONACIT 26104, UCV, Venezuela.

Teresa Edith Vargas. Doctora en Ciencias, mención Botánica, UCV, Venezuela. Asistente de Investigación y Profesora, Laboratorio de Biotecnología Vegetal,

Instituto de Biología Experimental (IBE), UCV, Venezuela. Maira Oropeza. Doctora en Ciencias, UCV, Venezuela. Profesora y Jefa del Laboratorio de

Mejoramiento Vegetal, IBE, UCV, Venezuela. Dirección: Apartado 47114-1041 Caracas, Venezuela. email: moropeza@ciens.ucv.ve

Para establecer una metodología eficiente para a propagação *in vitro* do inhame (*Dioscorea alata*) se obtiveram plantas a partir de tubérculos em condições de viveiro. Para micropropagação se extraíram segmentos do caule de 1cm de comprimento com um nó e 1-2 gemas laterais; para organogênese se utilizaram as plantas obtidas por micropropagação, das quais se dividiram segmentos de microesquejes. Os explantes foram cultivados em meio Murashige e Skoog (MS, 1962) suplementado com diferentes combinações hormonais. Para a micropropagação se utilizaram meios constituídos somente com os sais MS completos ou reduzidos a 1/5, e três meios suplementados com hormônios vegetais, obtendo-se uma média de 4,90 brotes por explante no meio suplementado com 0,5mg·l⁻¹ BA. Na multiplicação

massiva, o meio de cultivo foi suplementado com 2mg·l⁻¹ BA e se obteve uma média de 5,75 plantas por explante, aos 90 dias de cultivo. Para a indução de organogênese direta se utilizou MS suplementado com 1mg·l⁻¹ BA + 0,5mg·l⁻¹ ANA. Depois de 105 dias de cultivo se observou uma média de 25,15 brotes por explante. O 10% dos microesquejes cultivados apresentavam formação de calo e a regeneração de 5,3 brotes por fragmento de calo de ~1cm². A regeneração de *D. alata* por micropropagação se obtém depois de 4,5 meses de cultivo, enquanto que por organogênese se obtém aos 6 meses, mas com maior número médio de brotes por explante. Em ambos os sistemas, o enraizamento se logrou no mesmo meio usado para o estabelecimento do processo. As plantas regeneradas a partir destes sistemas se aclima-

el potencial de regeneración de plantas de *D. alata* preservadas *in vitro* con el de plantas micropropagadas recientes; los resultados mostraron 100% de regeneración de los explantes a partir de material *in vitro* mantenido en medio D-571 suplementado con 1,5% manitol + 0,1mg·l⁻¹ BA + 2g·l⁻¹ de carbón activado.

Igualmente, Dixit-Sharma *et al.* (2005) criopreservaron ápices caulinares de *D. deltoidea* usando la técnica de vitrificación y encapsulación-deshidratación. Encontraron que el contenido de diosgenina en las plantas regeneradas a partir de estos ápices era similar al de las plantas control. Recientemente Shu *et al.* (2005) utilizaron tallos, hojas y pecíolos como explantes y observaron que las hormonas vegetales tenían un efecto negativo sobre el desarrollo de los embriones somáticos obtenidos a partir del cultivo de calo de *D. zingiberensis*.

Dada la importancia alimenticia y medicinal que tiene el cultivo de *D. alata* (ñame) en Venezuela, la presente investigación tiene como objetivo establecer los procesos de micropropagación y organogénesis para esta especie.

Materiales Y Métodos

Material vegetal

Los tubérculos de *Dioscorea alata* fueron adquiridos en un local comercial e identificados como *D. alata* por Stephen

Tillet, Herbario de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Estos tubérculos de ~20cm de largo y ~10cm de diámetro, fueron lavados con agua y jabón líquido comercial y sumergidos en solución fungicida por 1h. Luego se dejaron secar a temperatura ambiente por 24h y se sembraron en bolsas plásticas de polietileno con tierra. La siembra se realizó de dos formas diferentes: a) colocando el tubérculo entero y b) cortado en segmentos definidos (cabeza, centro y terminal).

Las plantas desarrolladas a partir de estos tubérculos fueron utilizadas como fuente de explantes para la micropropagación. Las plantas *in vitro* obtenidas a partir del proceso de micropropagación fueron utilizadas como fuente de explantes para la organogénesis.

Micropropagación de *D. alata*

De las plantas desarrolladas a partir de tubérculos se extrajeron microesquejes de ~1cm de largo con un nudo y 1-2 yemas axilares, y fueron sembrados en condiciones de asepsia a razón de 4 microesquejes por frasco. Se cultivaron 30 explantes por tratamiento.

Los microesquejes fueron lavados con agua destilada y jabón líquido comercial por 5min, bactericida (Betadine 10%) por 10min, fungicida (Vitavax 1%) por 30min, hi-

poclorito de sodio 1% + 2 gotas de Tween 20 por 10min, seguidos de 3 lavados con agua destilada estéril (5min cada uno). Entre cada paso se realizaron lavados con agua destilada estéril. Los explantes desinfectados fueron trasladados a una cámara de flujo laminar donde se sembraron en los medios de cultivo correspondientes.

Los medios de cultivo utilizados para la inducción del proceso de micropropagación contenían las sales de Murashige y Skoog (MS, 1962) suplementados con 0,4mg·l⁻¹ tiamina, 100mg·l⁻¹ mio-inositol, 30g·l⁻¹ sacarosa, 100mg·l⁻¹ cisteína como antioxidante, con o sin adición de hormonas vegetales (Tabla I), y se solidificaron con 8g·l⁻¹ HIMEDIA agar extra puro. El pH de todos los medios fue ajustado a 5,8 y fueron esterilizados en autoclave a 120°C y 15 libras de presión por 20min. Después de esterilizar los me-

dios se adicionó 100mg·l⁻¹ de cefotaxima.

Los explantes fueron cultivados en estos medios por 45 días. Para la fase de multiplicación las plantas obtenidas fueron subcultivadas en los medios MM2 y MM3 (Tabla I), a razón de 41 plantas por experimento. Todas las etapas de la micropropagación se realizaron a 25 ± 1°C bajo luz fluorescente continua (50µmol·m⁻²·s⁻¹), siguiendo las condiciones ambientales recomendadas por Kadota y Niimi (2004). Semanalmente se realizaron observaciones usando un microscopio estereoscópico Zeiss para cuantificar el número de brotes por explante, el desarrollo de los brotes, formación de raíces, la oxidación de los microesquejes y la longitud de los explantes.

Organogénesis

Para el establecimiento del proceso de organogénesis se

TABLA I
MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS PARA LA MICROPROPAGACIÓN Y ORGANOGÉNESIS DE *D. alata* A PARTIR DE MICROESQUEJES

| Medio | MS (1962) | Hormona vegetal (mg·l ⁻¹) |
|-------|-----------|---------------------------------------|
| MMC1 | 1/5 | — |
| MMC2 | completo | — |
| MM1 | 1/5 | ANA (0,02) + BA (0,2) |
| MM2 | completo | BA (0,5) |
| MM3 | completo | BA (2) |
| MOC | completo | — |
| MO5 | completo | ANA (0,5) + BA (1) |

MMC1 y MMC2: medios control para la micropropagación; ANA: ácido naftalenoacético; BA: bencil adenina; MOC: medio control para la organogénesis.

TABLA II
NÚMERO PROMEDIO DE BROTES Y DE RAÍCES POR EXPLANTE OBTENIDOS EN LA MICROPROPAGACIÓN DE *D. alata* A LOS 45 DÍAS DE CULTIVO

| Medio | Número promedio de brotes/explante | Número promedio de raíces/explante |
|-------|------------------------------------|------------------------------------|
| MMC1 | 1,07 a | 5,60 a |
| MMC2 | 1,66 a | 5,40 a |
| MM1 | 2,38 b | 7,15 a |
| MM2 | 4,90 c | 5,25 a |
| MM3 | 4,06 d | 2,55 b |

Medias acompañadas de diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

TABLA III
ETAPA DE MULTIPLICACIÓN EN LA MICROPROPAGACIÓN DE *D. alata* A LOS 45 DÍAS DE SUBCULTIVO EN LOS MEDIOS MM2 Y MM3

| Medio | Nº de plantas cultivadas | Proliferación (Nº promedio de brotes/explante) | Promedio de longitud de los brotes (cm) |
|-------|--------------------------|--|---|
| MMC2 | 41 | 1,63 a | 4,95 a |
| MM2 | 41 | 4,92 b | 3,61 b |
| MM3 | 41 | 5,75 b | 2,88 c |

Medias acompañadas de diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

utilizaron plantas cultivadas *in vitro* obtenidas a partir de microesquejes, de las que se escindieron segmentos de tallo de aproximadamente 1cm de largo con 1-2 yemas axilares. Se cultivaron 30 explantes por tratamiento (Tabla I).

Para la multiplicación de los brotes obtenidos por este proceso se empleó el medio MO5 ($0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ANA + $1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ BA). Todas las etapas de la organogénesis se realizaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ bajo luz fluorescente continua ($50\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Las observaciones se realizaron cada 8 días, usando un microscopio estereoscópico para determinar la formación de callo, brotes, raíces, cambios morfológicos, coloración, tamaño, etc.; se calculó el número promedio de explantes con brotes y la longitud de los mismos.

Aclimatación de las plantas a condiciones de vivero.

Las vitroplantas se colocaron a temperatura ambiente por 2 días (endurecimiento), después se lavaron con agua para eliminar el agar y se transfirieron a macetas con dos diferentes sustratos: I. tierra negra abo-

nada y II. tierra negra abonada y arena de río lavada 1:1. Las macetas se colocaron en un ambiente con alta humedad (80-93% de humedad relativa a lo largo del día) y baja densidad de flujo fotónico ($10\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) manteniéndolos bajo riego diario por 4 semanas.

Análisis histológico

Con el objetivo de poder establecer la naturaleza del proceso de regeneración *in vitro* y determinar si la organogénesis fue directa o indirecta en los explantes cultivados, se realizaron cortes a mano alzada y se tiñeron con azul de Astra. Las observaciones fueron realizadas en un microscopio óptico Nikon 14 MLABP-2. Cada corte fue fotografiado con una cámara Nikon FDX-35 modelo H-III adaptada al microscopio óptico.

TABLA IV
EFECTO DE LAS HORMONAS VEGETALES EN LA ORGANOGÉNESIS DIRECTA DE *D. alata* A PARTIR DE MICROESQUEJES, LUEGO DE 105 DÍAS DE CULTIVO

| Medio | Promedio de brotes/explante | Promedio de longitud de los brotes (cm) |
|-------|-----------------------------|---|
| MOC | 1,69 a | 5,60 a |
| MO5 | 25,15 b | 3,67 b |

Medias acompañadas de diferentes letras difieren significativamente ($P < 0,05$).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos en este estudio no cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianzas, por lo que los resultados fueron analizados mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas relacionadas a la formación de brotes entre tratamientos, y la prueba de Duncan para determinar diferencias significativas entre medias, usando el programa Statistic 6.0.325.0.

En la etapa de inducción de brotes de la micropropagación se tomaron muestras al azar con un tamaño de 20 por cada tratamiento y una probabilidad $P < 0,05$ (Tabla II). En la etapa de multiplicación de los brotes, el análisis se realizó con un tamaño de muestra de 40 por cada tratamiento tomadas al azar con una probabilidad $P < 0,05$ (Tabla III). Para la organogénesis directa se tomó al azar una muestra de 20 por cada tratamiento con una probabilidad $P < 0,05$ (Tabla IV).

Resultados

De los tubérculos enteros se obtuvieron plantas vigorosas de ñame a los 30 días, mientras que de los segmentos de tubérculos de las categorías,

cabeza, centro y terminal se obtuvieron plantas vigorosas a los 60 días.

Cultivo de microesquejes (micropropagación)

El protocolo de desinfección ensayado en los microesquejes resultó ser adecuado para el establecimiento del cultivo aséptico, lográndose un 81,3% de microesquejes sin contaminación. También se observó el oscurecimiento de los medios de cultivo, producto de la oxidación fenólica. La aparición de la oxidación fue lenta debido a que se adicionó cisteína al medio de cultivo.

Luego de 45 días de cultivo se observó formación de brotes en todos los medios empleados, incluyendo los medios sin hormonas (Figura 1a, c). El mayor número promedio de brotes por explante se obtuvo en el medio MM2 suplementado con $0,5\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de BA (Figura 1b). Las raíces se desarrollaron en los mismos medios de inducción obteniéndose el mayor número promedio de raíces por explantes (7,15) en el medio MM1 (Tabla II).

Estos brotes fueron transferidos a medios frescos MM2 y MM3 tal como se detalla en la Tabla III. A los 15 días de cultivo se observó la for-

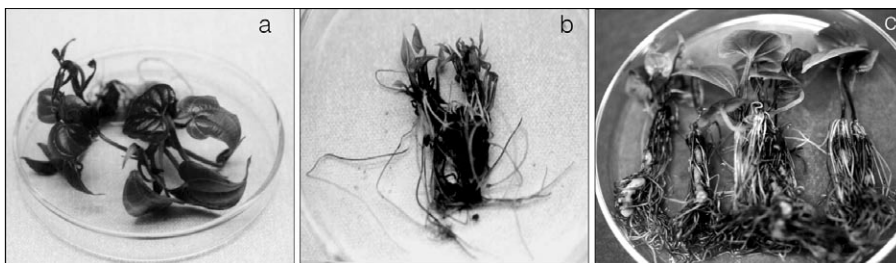


Figura 1. Desarrollo de brotes y raíces a partir de microesquejes de *D. alata* cultivados en diferentes medios de cultivo. a: medio MMC2, b: medio MM2, c: medio MMC1 con formación de microtubérculos.

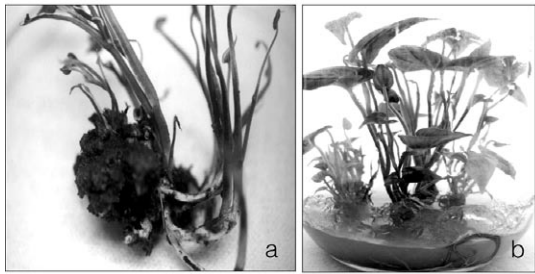


Figura 2. Organogénesis a partir de microesquejes de *D. alata*. A: regeneración de brotes a partir de callo formado en medio MO5, b: plantas desarrolladas por organogénesis directa después de 105 días de cultivo en medio MO5.

mación de nuevos brotes y a los 45 días de cultivo, en el medio MM2 se obtuvo un promedio de 4,92 brotes por explante con una longitud promedio de 3,61cm. En el medio MM3 se observó un promedio de 5,75 brotes por explante con una longitud promedio de 2,88cm, siendo este número mayor que el obtenido en la etapa de inducción del cultivo en el medio MM3 (un promedio de 4,06 brotes por explante). El número promedio de brotes obtenidos en los medios suplementados con hormonas vegetales fue mayor con respecto al control; no obstante, las plantas que se formaron en el medio control tuvieron mayor longitud, apreciándose que el tamaño promedio de los brotes disminuye cuando se aumenta la concentración de BA.

En el análisis estadístico no se encontró diferencias significativas entre los tratamientos MM2 y MM3, pero estos tratamientos difieren significativamente del control MMC2 (Tabla III).

A los 3 meses de cultivo se apreciaban abundantes raíces en las plantas regeneradas. En las plantas que fueron

mantenidas en el medio MMC1 con una disminución a 1/5 de las sales del medio MS se formó gran cantidad de raíces secundarias, y al cabo de 4 meses se observó la

formación de microtubérculos (Figura 1c). A los 6 meses el 82,1% de las plantas regeneradas, produjeron microtubérculos.

Organogénesis

Después de 45 días, en el medio MOC se observó el desarrollo de las yemas a partir de los microesquejes, mientras que en los microesquejes cultivados en el medio MO5, a los 15 días se apreciaba el inicio de la formación de brotes secundarios. Al cabo de 75 días de cultivo, en el 90% de los explantes se observó la formación de numerosos brotes por organogénesis directa. El 10% de los microesquejes cultivados en el medio MO5 presentaban formación de callo y regeneración de un promedio de 5,3 brotes por fragmento de callo de aproximadamente 1cm² (Figura 2a). El callo formado era de color marrón con zonas friables y zonas compactas. En la Figura 3a se observa el corte transversal de un callo originado a partir de un microesqueje luego de 3 meses de cultivo. En esta Figura se pueden detallar los 2 tipos de callos

encontrados. Se observó una zona de células muy unidas entre si, formando un callo con apariencia compacta (cc) y otra zona con células unidas en forma más laxa, formando un callo friable (cf).

Luego de 105 días de cultivo, en los microesquejes cultivados en el medio MO5 se observó un promedio de 25,15 brotes por explante en comparación con 1,69 brotes por explante presentes en el medio control (Tabla IV), obtenidos todos por organogénesis directa. La Figura 3b muestra el corte transversal de un brote originado a partir de tejido de callo compacto a los 3,5 meses de cultivo. Las plantas obtenidas en el medio MO5 (Figura 2b) presentaban una longitud promedio de 3,67cm, en contraste con las plantas obtenidas en el medio control (MOC) que tenían una longitud promedio de 5,60cm. Al igual que para la micropropagación, se observó la formación de raíces simultáneamente al desarrollo de los brotes en los medios empleados para organogénesis.

Utilizando un solo medio de cultivo (MO5) suplementado con una combinación de 0,5mg·l⁻¹ ANA + 1mg·l⁻¹ BA se logró observar la regeneración de plantas de *D. alata* mediante el proceso de organogénesis; es decir, la inducción de brotes, la multiplicación y el enraizamiento de los mismos. Estas plantas fueron transferidas a medio fresco MO5 por 6 semanas, para que los brotes continuaran su elongación para su posterior traspaso a tierra.

Aclimatación

Las plantas obtenidas por micropropagación y organogénesis, con una longitud promedio de 5,5cm, presentando un vástago bien desarrollado y abundantes raíces, fueron transferidas a los diferentes sustratos. Las plantas obtenidas por micropropagación alcanzaron estas características a los 4,5 meses, mientras que las plantas obtenidas por organogénesis tardaron 6 meses en alcanzar la madurez suficiente para pasar a la fase de aclimatación.

De 117 plantas provenientes de micropropagación y organogénesis se transplantaron 58 en el sustrato tierra negra abonada:arena de río lavada (1:1) y el 70,7% se aclimataron favorablemente. El 100% de estas plantas aclimatadas sobrevivió en condiciones de vivero. En el caso de las plantas transferidas al sustrato tierra negra, de 59 plantas se aclimataron 11,9% y de éstas sobrevivieron todas, una vez colocadas en condiciones de vivero (Figura 4).

En resumen, según los resultados obtenidos, para establecer un sistema eficiente de regeneración *in vitro* para *D. alata*, se recomienda sembrar tubérculos enteros para obtener en el menor tiempo (30 días) plantas sanas como fuentes de explantes. Igualmente se recomienda cultivar microesquejes en medios de Murashige y Skoog (1962) suplementados con una combinación de 0,5mg·l⁻¹ ANA + 1mg·l⁻¹ BA a 25 ±1°C bajo luz fluorescente continua

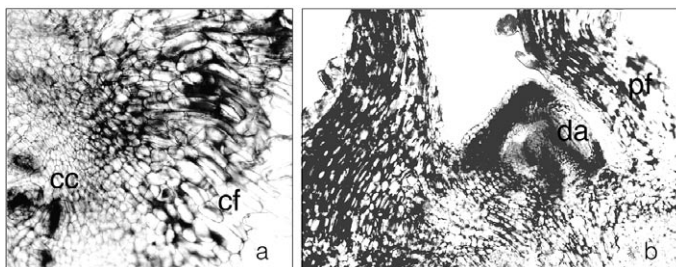


Figura 3. a: Callo formado a partir de la yema del microesqueje (40x). cc: callo compacto, cf: callo friable. b: Detalle de un brote originado a partir de callo (40X). pf: primordio foliar, da: domo apical.

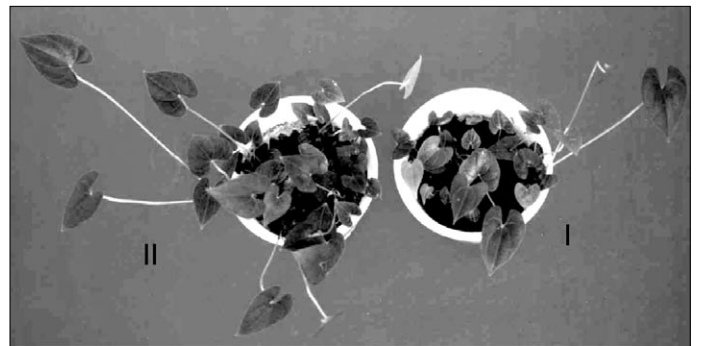


Figura 4. Plantas de *D. alata* después de tres meses aclimatadas a condiciones de vivero en los sustratos I y II.

(50 μ mol·m⁻²·s⁻¹); ya que luego de 6 meses de cultivo se obtendrán por organogénesis directa aproximadamente 25,15 plantas por explante, listas para ser aclimatadas en sustratos compuestos por tierra negra abonada: arena de río lavada (1:1), donde se puede lograr un 70,7% de aclimatación. Si bien por micropropagación las plantas listas para ser aclimatadas se obtienen en un lapso de tiempo un poco menor (4,5 meses), solo se obtiene un promedio de 5,75 brotes por explante, mientras que la producción de brotes por organogénesis es mayor.

Discusión

Micropropagación de *D. alata*

En la fase de establecimiento del proceso de micropropagación a partir de microesquejes se observó que el protocolo de desinfección utilizado resultó adecuado; sin embargo, la adición de 100mg·l⁻¹ del antibiótico cefatoxima a los medios de cultivo fue necesaria para inhibir el crecimiento de la flora bacteriana. La liberación de sustancias fenólicas durante el cultivo *in vitro* de la mayoría de los tejidos vegetales causa la muerte de los explantes los primeros días de cultivo, posiblemente debido a los efectos tóxicos de estos compuestos. En las diferentes variedades de ñame las sustancias fenólicas se oxidan rápidamente (Acosta, 1987). El éxito logrado en la fase de establecimiento del cultivo en este caso se debe en parte a que los compuestos fenólicos fueron eliminados o neutralizados de manera eficiente con el uso de cisteína.

Una vez establecido el cultivo de microesquejes de *D. alata*, el desarrollo de plantas completas se observó en los medios de cultivo sin hormonas vegetales, lo que representa una ventaja para la micropropagación de esta especie por la reducción de costos. Sin embargo, un mayor número de brotes es obtenido al añadir hormonas vegetales a

los medios de cultivo, observándose una relación lineal directa entre la concentración de BA en el medio de cultivo y el número de brotes formados a los 45 días de cultivo. El hecho de que en MM1 se logró el mayor número promedio de raíces pudo ser debido a la disminución de la concentración de las sales del medio MS y a la adición de 0,02mg·l⁻¹ de ANA al medio de cultivo. Según Orellana (1998), la adición de esta auxina favorece la formación de raíces.

Las diferencias significativas observadas en el número promedio de brotes obtenidos en los diferentes tratamientos utilizados en la micropropagación (Tabla II) indican que hubo un efecto de los reguladores de crecimiento utilizados sobre la inducción de brotes. Estos resultados coinciden con lo descrito por Hurtado y Merino (1987), quienes señalaron que en los ápices caulinares la concentración endógena de citoquininas es muy baja, debido a que la principal fuente de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de la misma en los medios de cultivo es esencial para inducir el proceso de división celular y el desarrollo de los brotes.

Con respecto a la producción de raíces se observó que en MM3 la formación de raíces no se vio favorecida, posiblemente debido a la alta concentración de BA usada (2mg·l⁻¹). En este caso, el balance de citoquinina-auxina indujo el desarrollo de brotes pero inhibió la formación de raíces. En los demás tratamientos no se encontraron diferencias significativas entre las medias en la producción de raíces, demostrando que se pueden inducir brotes y raíces en el mismo medio de cultivo, no enraizamiento o el uso de medios de cultivo suplementados con auxinas para la producción de las mismas.

En la fase de multiplicación, el análisis estadístico no refleja diferencias significativas entre los tratamientos

MM2 y MM3 (Tabla III); sin embargo, estos tratamientos difieren significativamente del control MMC2. Este resultado refleja la importancia del uso de citoquininas para la multiplicación de los brotes de *D. alata*. Además se puede observar que a mayor concentración de BA empleada hay mayor número de brotes, pero de menor longitud.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Forsyth y Van Staden (1982) para la especie *D. bulbifera*, donde la inducción y multiplicación de brotes ocurrió en un mismo medio MS suplementado con 0,5 o 1mg·l⁻¹ BA, logrando la regeneración de 6 y 9 brotes por explante respectivamente. Cabrera *et al.* (2003), en la multiplicación de *D. rotundata* Poir, realizaron estudios similares utilizando el medio de cultivo MS (1962), con 1mg·l⁻¹ BA + 0,01mg·l⁻¹ ANA, alcanzando un máximo número promedio de 2,66 brotes por explante con una longitud de 3,94cm a los 45 días de cultivo.

Al igual que para la fase de establecimiento, en esta fase se evidencia que no es necesaria la adición exógena de hormonas a los medios de cultivo para inducir la formación de raíces. Esto coincide con lo expuesto por Orellana (1998), quien señaló que existen especies donde el empleo de hormonas vegetales en el medio de cultivo no es necesario para la inducción de raíces. En el medio MMC1 las sales MS (1962) estaban reducidas a 1/5, lo cual favorece la formación de raíces y la formación de microtubérculos. La producción de microtubérculos de alta calidad *in vitro* es otra alternativa para propagar esta especie, ya que facilita la transferencia de germoplasma; además se evita la fase de aclimatación de las plantas. Una alta producción de microtubérculos a partir del cultivo de microesquejes ha sido reportada para plantas de *D. opposita* (Kohmura *et al.*, 1995), *D. floribunda* (Sengupta *et al.*, 1984), *D. alata* L y *D. abyssinica* (Martine y Cappadocia, 1991).

Organogénesis

Los resultados presentados en la Tabla IV sugieren que la combinación de 0,5mg·l⁻¹ ANA + 1mg·l⁻¹ BA fue adecuada para inducir la organogénesis directa. Este medio además indujo la formación de callo en el 10% de los explantes cultivados. El análisis histológico demostró organogénesis indirecta de brotes a partir de estos callos.

En el tratamiento MO5 se observó el mayor número promedio de brotes por explante, pero de menor longitud. Este resultado sugiere que la combinación de BA y ANA usada era adecuada para inducir la organogénesis directa.

Al igual que para la micropropagación, el hecho que no se requiera un tratamiento adicional para las etapas de multiplicación y enraizamiento es ventajoso para el establecimiento del sistema de organogénesis; primero, es el ahorro en costo que implica no adicionar más reguladores de crecimiento al medio de cultivo; y segundo, es el ahorro en tiempo de espera para la inducción de las raíces.

Sengupta *et al.*, (1984) lograron la regeneración de plantas a través de la organogénesis usando explantes de microesquejes y pecíolos de *D. floribunda*, empleando el medio MS (1962) suplementado con la combinación de 8mg·l⁻¹ ANA + 2mg·l⁻¹ BA y obtuvieron callo y proliferación de brotes a los 15-20 días de cultivados los explantes y regeneración de 20-30 plantas. Kohmura *et al.* (1995) al cultivar hojas de *D. opposita* en un medio de MS (1962) conteniendo 2mg·l⁻¹ BA obtuvieron la regeneración de brotes y el desarrollo de éstos con una combinación de 0,02mg·l⁻¹ ANA + 0,2mg·l⁻¹ zeatina y 3% de sacarosa.

En general, en el presente trabajo la regeneración de plantas de *D. alata* por micropropagación a partir de microesquejes, se obtiene a los 4,5 meses, mientras que por organogénesis el lapso de tiempo es mayor, ascendiendo a los 6

meses de cultivo, pero con una mayor producción de brotes.

Aclimatación

En el sustrato tierra negra se observó un bajo porcentaje de aclimatación de las plantas de *D. alata* obtenidas a partir de la micropropagación y la organogénesis, debido a que las raíces de estas plantas no terminaron su desarrollo, ni tampoco se promovió la formación de éstas, conllevando a su muerte. El sustrato tierra negra: arena lavada (1:1) permitió la mejor adaptación de las plantas a condiciones de vivero; posiblemente el uso de arena permitió una buena aireación y un buen drenaje al conferir porosidad al sustrato, resultando adecuado para la funcionalidad de las raíces. Este resultado demuestra que la técnica utilizada para el endurecimiento de las plantas de *D. alata* fue simple y eficiente. Un resultado similar fue obtenido por Asemota *et al.* (1997) en la aclimatación de plantas de *D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. alata*, y *D. trifida*.

En general, en el presente trabajo se logró el estable-

cimiento de dos sistemas de regeneración *in vitro*, por micropropagación y por organogénesis para *Dioscorea alata*, la especie de ñame de mayor consumo en Venezuela. Estos sistemas resultaron altamente eficientes (altos índices de formación de brotes) y permiten la obtención de plantas de ñame sanas y adaptadas a condiciones de vivero en un lapso de tiempo que oscila entre 5 meses (micropropagación) y 6,5 meses (organogénesis).

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a Eva de García por permitir el desarrollo de esta investigación en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela CDCH-UCV por el financiamiento (PI - 03.33-5447/04).

REFERENCIAS

Acosta EMC (1987) *El cultivo del Ñame Dioscorea sp.* 2ª ed. TOA. Santa Fe de Bogotá, Colombia. 79 pp.

Asemota HN, Osarosemwen A, Iyare AO, Monhammed HA (1997) Acclimatization of *in vitro* grown yam (*Dioscorea* spp.) plantless and some enzyme changes. *Trop. Agric. (Trinidad)* 74: 312-318

Borges M, Ceiro W, Meneses S, Aguilera N, Vázquez J, Infante Z, Fonseca M (2004) Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 76: 87-90.

Cabrera M, Torres Y, Santos A, Basail M, Rayas A, Medero V, Robaina A, López J, García M, Ventura JC, Gutiérrez V, Otero E, Bauta MM (2003) *Establecimiento y Multiplicación in vitro del clon de Ñame Blanco de Guinea (Dioscorea rotundata Poir)*. INIVIT. Villa Clara, Cuba. 7 pp.

Dixit-Sharma S, Ahuja-Ghosh S, Mandal BB, Rivastava PS (2005) Metabolic stability of plants regenerated from cryopreserved shoot tips of *Dioscorea deltoidea* - an endangered medicinal plant. *Sci. Hort.* 105: 513-517.

Forsyth C, Van Staden J (1982) An improved method of *in vitro* propagation of *Dioscorea bulbifera*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1: 275-281.

Hurtado D, Merino ME (1987) *Cultivo de Tejidos Vegetales*. Trillas. México. 229 pp.

Kadota H, Niimi Y (2004) Improvement of micropropagation

of Japanese yam using liquid and gelled medium culture. *Sci. Hort.* 102: 461-466.

Kohmura H, Araki H, Imoto M (1995) Micropropagation of 'Yamatoimo' Chinese yam (*Dioscorea opposita*) from immature leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 40: 271-276.

Martine J, Cappadocia M (1991) *In vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. "Brazo fuerte" and "Florido" and *D. abyssinica* Hoch. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 26: 147-152.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Orellana P (1998) Propagación Vía Organogénesis. En Pérez-Ponce JN (Ed.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Vol 1. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara, Cuba. pp. 151-178.

Sengupta J, Mitra GC, Sharma AK (1984) Organogenesis and tuberization in culture of *Dioscorea floribunda*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 3: 325-331.

Shu Y, Ying-Cai Y, Hong-Hui L (2005) Plant regeneration through somatic embryogenesis from callus cultures of *Dioscorea zingiberensis*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 80: 157-161