

## Efecto de la concentración de sacarosa y de reguladores del crecimiento en la tuberización *in vitro* de *Dioscorea alata* L. variedad Cartagena

Maylen García Corria<sup>1\*</sup>, Maritza Escalona<sup>2</sup>, Silvio Meneses<sup>1</sup>. \* Autor para correspondencia

<sup>1</sup> Universidad de Granma. Carretera Bayamo-Manzanillo, km 17, Apdo. 21. Bayamo. Granma. Cuba. e. mail: maylen@udg.co.cu.

<sup>2</sup> Centro Bioplantas. Universidad de Ciego de Avila. Carretera a Morón, km 9. Ciego de Avila. Cuba.

### RESUMEN

Entre las especies de *Dioscorea* de las que se utilizan sus tubérculos para el consumo humano, *D. alata* L. es una de las más productivas e importantes económicamente. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la concentración de sacarosa (0, 2, 4, 6, 8, 10%) y de reguladores del crecimiento (ANA 0, 0.27, 2.7, 27, 54  $\mu\text{M}$  y 6-BAP 0, 0.22, 2.2, 22, 44  $\mu\text{M}$ ) en la tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) variedad Cartagena. Los segmentos nodales se colocaron en medio de cultivo MS suplementado con tiamina 1  $\text{mg.l}^{-1}$ , mio-inositol 100  $\text{mg.l}^{-1}$ , L-cisteína 20  $\text{mg.l}^{-1}$ , 6% agar y pH 5.7. Los cultivos fueron mantenidos en cámara de luz artificial ( $37 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Las concentraciones de sacarosa de 6 y 8% favorecieron la producción de mayor número de microtubérculos y de mayor tamaño comparados con las bajas concentraciones (0, 2 y 4%). El peso de los mismos se incrementó con el aumento de las concentraciones de sacarosa y disminuyó con la concentración más alta empleada (10%). De forma similar ocurrió con la biomasa total del tubérculo. Por otro lado, se observó un incremento en el tamaño de los microtubérculos y en la biomasa total a las más altas concentraciones de ANA probadas (27 y 54  $\mu\text{M}$ ). Tanto el número como el peso de los microtubérculos disminuyeron cuando se utilizó 6-BAP en el medio de cultivo.

Palabras clave: cultivo de tejidos, microtuberización, ñame

### ABSTRACT

Among the species of *Dioscorea* which tubers are used as human food, *D. alata* L. is one of the most productive and important economically. In this work the effect of sucrose (0, 2, 4, 6, 8, 10%) and growth regulators concentration (ANA 0, 0.27, 2.7, 27, 54  $\mu\text{M}$  and 6-BAP 0, 0.22, 2.2, 22, 44  $\mu\text{M}$ ) on *in vitro* tuberization of yam (*Dioscorea alata* L.) var. Cartagena were evaluated. The nodal segments were established in a MS culture medium supplemented with thiamine 1  $\text{mg.l}^{-1}$ , myo-inositol 100  $\text{mg.l}^{-1}$ , L-cysteine 20  $\text{mg.l}^{-1}$ , agar 6%. The pH was adjusted to 5.7. The cultures were kept under conditions of artificial light ( $37 \mu\text{M.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). The sucrose concentrations 6 and 8% favored the production of major number of microtubers and of a larger size compared to the lower concentrations (0, 2, 4%). The weight of the microtubers increased with the increasing of the concentrations of sucrose and declined with the highest concentration used (10%). The same trend was observed in the total tuber biomass. On the other hand, an evolvment in size and the total tuber biomass on microtuber was observed at highest concentrations of ANA tested (27 and 54  $\mu\text{M}$ ). Both, the number and weight of microtubers declined when high concentrations of 6-BAP in the culture medium were used (2.2, 22 and 44).

Key words: microtuberization, tissue culture, yam

### INTRODUCCIÓN

Entre las especies de *Dioscorea* de las que se utilizan sus tubérculos para el consumo humano, *D. alata* L. es una de las más productivas e importantes económicamente (Degras, 1986; Mantell *et al.*, 1998).

Los brotes cultivados *in vitro* en muchas especies de *Dioscorea*, son capaces de producir microtubérculos bajo ciertas condiciones de inducción y estos presentan un gran potencial para la multiplicación y distribución rápida de material vegetal libre de microorganismos patógenos en los programas de intercambio internacional de germoplasma de ñame.

La formación de microtubérculos en *Dioscorea* está influenciada por varios factores tales como el tipo de citoquinina, de auxina, la concentración de sacarosa o el fotoperíodo (Mantell y Hugo, 1989; Jean y Cappadocia 1992; Ng, 1992; Perea y Buitrago, 2000).

La sacarosa ha sido ampliamente utilizada como fuente de carbohidratos en la mayoría de las investigaciones *in vitro* de todas las especies y en específico del ñame. Además, tradicionalmente ha sido empleada para estos fines en la producción de microtubérculos de papa y de ñame (Jiménez *et al.*, 1999; Salazar y Beltrán, 2002). Añadida al medio de cultivo, esta puede actuar solo como fuente de carbohidratos, como sustancia osmótica o como ambas (Khuri y Moorby, 1995).

Existen varias referencias en la literatura científica donde se analizan los efectos en la microtuberización de las concentraciones de sacarosa y de diferentes reguladores del crecimiento. Por ejemplo Ng (1988) añadió concentraciones de 3, 5, 8 y 10% de sacarosa al medio de cultivo con 0.5 mg.l<sup>-1</sup> de kinetina en *Dioscorea rotundata* Poir y obtuvo el porcentaje de tuberización más alto en el medio de cultivo con 8% en combinación con 24 horas de fotoperiodo. Sin embargo, en *Dioscorea alata* L. (Ammirato, 1984) y en *Dioscorea bulbifera* (Sengupta *et al.*, 1984; Forsyth *et al.*, 1984) se logró la formación de microtubérculos en el medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) con ácido naftalenacético (ANA).

Teniendo en cuenta los elementos expuestos anteriormente se precisa establecer para cada especie y variedad de ñame las condiciones en que se favorezca la formación de microtubérculos. Por ello en este estudio se evaluó el efecto de la concentración de sacarosa y de reguladores de crecimiento en la tuberización *in vitro* de *Dioscorea alata* variedad Cartagena.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se cultivaron tubérculos de *Dioscorea alata* L var. Cartagena en macetas en condiciones de laboratorio. De ellos se tomaron segmentos nodales que fueron establecidos *in vitro* y luego fueron subcultivados cada 30 días en el medio de cultivo MS suplementado con tiamina 1 mg.l<sup>-1</sup>, mio-inositol 100 mg.l<sup>-1</sup>, L-cisteína 20 mg.l<sup>-1</sup> y 6% agar. El pH fue ajustado a 5.7 previo a la esterilización. En cada frasco de cultivo se colocaron cuatro explantes.

Para la inducción de la formación de los microtubérculos, se realizaron tratamientos de forma independiente, en el mismo medio de cultivo mencionado anteriormente al que se adicionaron

primeramente diferentes concentraciones de sacarosa (0, 2, 4, 6, 8, 10 %), sin ningún regulador del crecimiento, y luego se empleó ácido naftalenacético (ANA): 0, 0.27, 2.7, 54 µM y 6-Bencilamino purina (6-BAP): 0, 0.22, 2.2, 22, 44µM, en ambos casos con 8 % de sacarosa.

A las 20 semanas de cultivo a una temperatura de 25 ± 2 °C, iluminación de 37 µM.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, proporcionada por luz artificial de lámparas fluorescentes con un foto período de 16 horas, se evaluó el número de explantes tuberizados, el número promedio de microtubérculos por explante, el peso promedio de los microtubérculos por explante (mg) y la biomasa total de los microtubérculos (mg).

Los datos se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza de clasificación simple. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de los rangos múltiples de Duncan para p<0.05 con la ayuda del paquete estadístico Complete Statistical System (CSS).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron microtubérculos de diferentes tamaños, ubicados principalmente en la parte aérea del tallo. La mayoría presentó un diámetro aproximado entre 5 y 15 mm y una longitud de 8-25 mm.

Los altos niveles de sacarosa (8 y 10 %) retardaron el crecimiento del brote y provocaron la formación de raíces tanto en la base del tallo como en los entrenudos. El número de microtubérculos promedio por explante fue superior en 6 y 8 % de sacarosa y disminuyó en niveles inferiores y superiores a esta concentración (Tabla 1). De forma similar ocurrió en el número promedio de microtubérculos por explante y el peso de los mismos que fue superior significativamente con 8% de sacarosa.

Tabla 1. Efecto de la concentración de sacarosa en la inducción de la tuberización *in vitro* en segmentos nodales de *Dioscorea alata* L variedad Cartagena.

Concentración de sacarosa (%)	No. explantes cultivados	No. de explantes con MT	No. promedio de MT por explante	Peso promedio de MT por explante (mg)	Biomasa Total MT (mg)
0	36	85	1.8 <sup>bc</sup>	70.41 <sup>d</sup> ±.2	121.31
2	36	90	1.5 <sup>c</sup>	130.04 <sup>c</sup> ±.4	160.31
4	36	85	2.1 <sup>b</sup>	131.3 <sup>c</sup> ±.4	173.22
6	36	100	4.0 <sup>a</sup>	235.5 <sup>b</sup> ±.6	741.04
8	36	94	4.4 <sup>a</sup>	416.8 <sup>a</sup> ±.7	538.01
10	36	80	1.7 <sup>c</sup>	72.0 <sup>d</sup> ±.2	96.03

MT- microtubérculos. Medias con igual denominación en una columna no difieren estadísticamente para p<0.05

En la tabla 2 se muestra el efecto del ANA en el proceso de tuberización. Se observó un incremento en el tamaño de los microtubérculos y en la biomasa total a las concentraciones de ANA más altas empleadas (27 y 54  $\mu\text{M}$ ), a pesar de que el número promedio de microtubérculo por explante fue bajo. Esta última concentración (54  $\mu\text{M}$ ) no influyó en el número de microtubérculos obtenidos. En este caso la formación de raíces fue pobre y se observaron callos.

La respuesta del explante a tuberizar así como el número y peso de los microtubérculos disminuyeron con respecto al control cuando se utilizaron 0.22  $\mu\text{M}$  de 6-BAP en el medio de cultivo. Con el aumento de los niveles de 6-BAP superiores a 0.22  $\mu\text{M}$  (Tabla 3), no hubo respuesta a esta citoquinina.

Algunos autores han referido un doble papel de la sacarosa en el desarrollo de los microtubérculos. Además de ser una fuente de carbono adecuada y fácilmente asimilable por las plantas *in vitro* y que se convierte en almidón en el desarrollo del microtubérculo, la sacarosa, a una concentración de 80  $\text{g.l}^{-1}$ , también proporciona una osmolaridad favorable para el desarrollo del microtubérculo (Khuri y Moorby, 1995).

En el cultivo de la papa la concentración óptima de sacarosa para la formación de microtubérculos se refiere entre 60 y 80  $\text{g.l}^{-1}$  (Abbot y Belcher, 1986; Dodds *et al.*, 1992; Jiménez *et al.*, 1999). Las concentraciones inferiores o superiores a estas

condujeron a una tuberización más lenta con pocos microtubérculos y muy pequeños.

Diferentes autores plantean que las citoquininas juegan un papel importante en el proceso de la tuberización en varias especies de plantas (Melis y Van Staden, 1984), sin embargo, en el ñame se han obtenido resultados contrarios.

La kinetina a 4  $\mu\text{M}$  favoreció la tuberización en *D. opposita* (Asahira y Nitsh, 1968) y en *D. alata* y *D. bulbifera* se obtuvo alta frecuencia de tuberización con el uso de 2.5  $\mu\text{M}$  de kinetina bajo un fotoperiodo de 8 y 16 horas (Mantell y Hugo, 1989). Sin embargo, Forsyth y Van Staden (1984) encontraron un efecto inhibitorio con el uso de altas concentraciones de kinetina (20 a 40  $\mu\text{M}$ ).

Ammirato (1982) observó en *D. alata* y en *D. bulbifera* la formación de microtubérculos con 0.1  $\mu\text{M}$  de zeatina, mientras que altas concentraciones (1-10  $\mu\text{M}$ ) formaron brotes múltiples.

Los diferentes resultados encontrados en la literatura científica se deben a la influencia de varios factores como son el genotipo empleado, las mezclas de sales nutrientes y las diferentes concentraciones de reguladores del crecimiento añadidos, junto a las variaciones de la intensidad de la luz y la temperatura. Sin embargo, de forma general el empleo de 8% de sacarosa ha producido el más alto rendimiento en la formación de microtubérculos *in vitro*.

Tabla 2. Efecto del ANA en la inducción de la tuberización *in vitro* en segmentos nodales de *Dioscorea alata* L variedad Cartagena.

ANA ( $\mu\text{M}$ )	No. explantes cultivados	No. de explantes con MT (%)	No. promedio de MT por explante	Peso promedio de MT por explante (mg)	Biomasa Total MT (mg)
0	36	93	1.3 <sup>b</sup>	39.04 <sup>c</sup> ±.2	63.75
0.27	36	91	1.5 <sup>b</sup>	19.47 <sup>d</sup> ±.2	42.05
2.7	36	97	1.8 <sup>a</sup>	28.87 <sup>cd</sup> ±.4	117.00
27	36	100	2.0 <sup>a</sup>	420.10 <sup>a</sup> ±.6	790.00
54	36	97	1.3 <sup>bc</sup>	327.72 <sup>b</sup> ±.7	499.35

MT- microtubérculos. Medias con igual denominación en una columna no difieren estadísticamente para  $p < 0.05$ .

Tabla 3. Efecto del 6-BAP en la inducción de la tuberización *in vitro* en segmentos nodales de *Dioscorea alata* L variedad Cartagena.

6-BAP ( $\mu\text{M}$ )	No. explantes cultivados	No. de explantes con MT (%)	No. promedio de MT por explante	Peso promedio de MT por explante (mg)	Biomasa Total MT (mg)
0	30	94	2.01 <sup>a</sup>	40.8 <sup>a</sup> ±.4	36.5
0.22	30	80	1.3 <sup>b</sup>	25.3 <sup>b</sup> ±.6	23.6
2.2	30	0	0	0	0
22	30	0	0	0	0
44	30	0	0	0	0

MT- microtubérculos. Medias con igual denominación en una columna no difieren estadísticamente para  $p < 0.05$ .

## CONCLUSIONES

Se logró la obtención de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) que se favoreció con la concentración de 8% de sacarosa.

Se comprobó que concentraciones de ANA de 27 y 54  $\mu$ M promovieron un incremento en el tamaño de los microtubérculos y en la biomasa total de los mismos, sin embargo, en presencia de 6-BAP la respuesta a la tuberización fue negativa.

## REFERENCIAS

- Abbot, AJ, Belcher AR (1986) Potato tuber formation *in vitro*. En: Withers LA, Alderson PG (eds) Plant Tissue Culture and its agricultural applications, pp. 113-122. Butterworths, London
- Ammirato, PV (1984) Yams. En: Ammirato PV, Evans DA, Shart WR, Yamada Y (eds) Handbook of Plant Cell Culture, Vol 3, pp 327-354. Macmillan, New York
- Dodds, JH, Silva-Rodríguez D, Tovar P (1992) Micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L). En: Bajaj YSP (ed) Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 19: high-tech and micropropagation II, pp.91-106. Springer, Berlin Heidelberg, New York
- Forsyth, C, Van Staden J (1984) Tuberization of *Dioscorea bulbifera* stem nodes in culture. J. Plant Physiol. 115: 79-83
- Garnern, BJ (1989) The induction and development of potato microtubers *in vitro* on media free of growth regulating substances. Ann Bot 63: 663-674
- Hussey, G, Stacey NJ (1984) Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) Ann Bot 53: 565-578
- Khuri, S, Moorby (1995) Investigation into the role of sucrose in potato cv. Estima microtuber production *in vitro*. Ann Bot 75: 295-303
- Lawrence, CH, Baker WG (1963) A study of tuberization in the potato, *Solanum tuberosum*. Am Potato J 40: 349-356
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473- 497
- Ng, SYC (1988) *In vitro* tuberization in white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). Plant Cell Tiss. Org. Cult. 14: 121-128
- Salazar, R, Beltran J (2002) Microtuberización en ñame (*Dioscorea alata* L.) var. 'Pico de Botella'. Revista Colombiana de Biotecnología 2: 27-32
- Sengupta, J, Mitra GC, Sharma AK (1984) Organogenesis and tuberization in culture of *Dioscorea floribunda*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 3: 325-331