

Empleo de métodos biotecnológicos para la propagación de ñame

Manuel A. Cabrera Jova

Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo CP. 53 000, Villa Clara, Cuba. e-mail: mcabrera@inivit.cu

RESUMEN

En el cultivo del ñame, la propagación convencional presenta bajos índices de multiplicación. Por ello, ha sido necesario el uso de métodos biotecnológicos para garantizar la disponibilidad de material vegetal de plantación. La producción de plantas *in vitro* y microtubérculos permite la obtención de semillas con calidad fisiológica y sanitaria, pero los protocolos desarrollados han presentado limitaciones para su empleo comercial. Los microtubérculos presentan numerosas ventajas en comparación con las plantas *in vitro*, pero estos se han obtenido en medios de cultivo en estado semisólido y se han caracterizado por una masa fresca promedio inferior a 0.5 g que ha limitado su utilización. El empleo de sistemas de cultivo semi-automatizado puede constituir una alternativa de gran interés para la formación de microtubérculos de ñame que permita emplearlos como material vegetal de plantación directo en campo. El presente trabajo presenta una revisión de literatura científica sobre los aspectos anteriores.

Palabras clave: *Dioscorea* spp., material vegetal de plantación, microtubérculos

ABSTRACT

Conventional propagation of yam shows low rates of multiplication. Therefore, it has been necessary to use biotechnological methods to ensure the plant material for planting. Production of *in vitro* plants and microtubers allows obtaining seed with physiological quality and health, but protocols developed have presented limitations for commercial use. Microtubers have many advantages compared to *in vitro* plants, but these have been obtained in semisolid culture media. Besides, the average fresh mass has been less than 0.5 g which has limited their use. The use of semi-automated culture systems can be a very interesting alternative for yams microtubers formation using them as plant material for field planting. This paper presents a review of scientific literature on the above aspects.

Key words: *Dioscorea* spp., vegetable material of plantation, microtuber

CONTENIDO

EL CULTIVO DEL ÑAME. GENERALIDADES

Origen y distribución Sistemática y botánica

Importancia económica del cultivo

Métodos de propagación

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ÑAME

Métodos de propagación *in vitro*

Establecimiento de plantas *in vitro*

Producción de tubérculos *in vitro*

AUTOMATIZACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN

Empleo de medios de cultivo líquidos. Ventajas y desventajas

Sistemas de Inmersión Temporal

Producción de microtubérculos en sistemas de cultivo automatizados

EMPLEO DE MICROTUBÉRCULOS COMO MATERIAL VEGETAL DE PLANTACIÓN EN CAMPO

INTRODUCCIÓN

El cultivo del ñame (*Dioscorea* spp.) ha contribuido a los requerimientos energéticos y nutricionales de una gran parte de las

poblaciones en los países en desarrollo (Perea, 2001; Tamiru *et al.*, 2008). Por su amplia gama de usos y su eficiencia para producir energía digestible, se ha considerado junto al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), como uno de

los tubérculos que más se producirán en los próximos años para la alimentación humana (Scott *et al.*, 2006).

Dentro de las más de 600 especies del género *Dioscorea*, *Dioscorea alata* L. es una de las más cultivadas en el mundo. Desde que esta especie se comenzó a cultivar por el hombre se ha propagado por tubérculos enteros, secciones de tubérculos o bulbillos aéreos. El uso continuado de este tipo de material vegetal de plantación tiene el inconveniente de que al plantarse de un año para otro en campo, se puede infestar por microorganismos patógenos y perder calidad fisiológica y sanitaria (Amusa *et al.*, 2003; Ovono *et al.*, 2007).

En Cuba, su producción ha ayudado a la diversidad y estabilidad alimentaria. Tradicionalmente este cultivo ha constituido una fuente importante de ingresos y empleo 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 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.

Diferentes métodos biotecnológicos también han sido empleados para la propagación de ñame pero la producción de plantas *in vitro* y microtubérculos, tienen aún limitaciones para su uso como material vegetal de plantación (Balogun *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007).

En el país, se han desarrollado protocolos de propagación *in vitro* de ñame por organogénesis, a partir de segmentos nodales, en diferentes clones (Medero *et al.*, 1999; Borges *et al.*, 2004). Estos han presentado bajos coeficientes de multiplicación y supervivencia de las plantas en la fase de aclimatización y en campo. Por ello, se requiere continuar buscando alternativas para la producción de material vegetal de plantación.

Según Balogun (2005) y Ovono *et al.* (2007) en el cultivo del ñame, la producción de microtubérculos tiene un gran potencial como

alternativa para la propagación. Pueden ser utilizados en los programas de producción de material vegetal de plantación, mejoramiento genético y conservación de germoplasma, debido a que los microtubérculos se pueden producir sin tener en cuenta la época del año, y a diferencia de las plantas *in vitro*, pueden ser almacenados por un período más prolongado de tiempo, sin perder su potencial de brotación (Jasik y Mantell, 2000; Mbanaso *et al.*, 2007; Pathirana *et al.*, 2008).

En *Dioscorea alata* L., la tuberización *in vitro* se ha desarrollado principalmente en medios de cultivo en estado semisólido y se ha caracterizado por la formación de pequeños microtubérculos con una masa fresca promedio inferior a 0,5 g (García *et al.*, 2004; Vaillant *et al.*, 2005; Balogun, 2009). Microtubérculos con estas características han presentado limitaciones tanto para la producción de microtubérculos en la fase de aclimatización, como para su plantación directa en campo (Ijoyah *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2007; Balogun, 2009).

Una de las alternativas para incrementar la masa fresca de los microtubérculos en el cultivo de la papa ha sido el empleo combinado de medios de cultivo en estado líquido y sistemas de cultivo semi-automatizados (Teisson y Alvard, 1999; Pérez *et al.*, 2001; Piao *et al.*, 2003; Jiménez, 2005). Dentro de estos se han destacado los sistemas de inmersión temporal (SIT) basados en el contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes y en la renovación periódica de la atmósfera del frasco de cultivo (Escalona, 2006).

El presente trabajo se realizó con el objetivo de presentar una revisión de la literatura científica sobre los aspectos anteriores y las tendencias en la producción de microtubérculos de ñame en sistema de inmersión temporal que pudieran ser empleados como material vegetal para la plantación directa en campo.

EL CULTIVO DEL ÑAME. GENERALIDADES

Origen y distribución

El género *Dioscorea* comprende varias especies originarias de diferentes áreas geográficas. *Dioscorea alata* L. es nativa del

sudeste Asiático, de donde se extendió a Indonesia, África y América Tropical. En los trópicos ocupa las mayores áreas cultivadas y constituye una excelente fuente de carbohidratos (Janssens, 2001; Tamiru *et al.*, 2008).

En Cuba está representada por 87 clones 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 también algunos clones se plantan y consumen en otras áreas del territorio nacional (Milián *et al.*, 2005).

Sistemática y botánica

El ñame (*Dioscorea*) es un cultivo tropical y subtropical. Pertenecen a este género más de 600 especies de plantas monocotiledóneas anuales, dioicas, de flores pequeñas rosadas o crema (Perea, 2001). Su ubicación taxonómica, según Janssens (2001) es la siguiente:

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Dioscoreales*

Familia: *Dioscoreaceae*

Género: *Dioscorea*

Especie: *Dioscorea alata* L.

Dioscorea alata L. es poliploide en grado avanzado y presenta un número de cromosomas $2n = (3x a 8x)$.

Esta especie se caracteriza por presentar tallos alados de color verde o morados, sin espinas, la torsión es en sentido contrario al movimiento de las manecillas del reloj y pueden alcanzar una longitud de dos a seis metros. Las flores en las plantas masculinas pueden encontrarse en forma de panícula, mientras que en las plantas femeninas están en solitario en forma de espigas. Obtener semillas fértiles en esta especie es muy difícil. Los tubérculos pueden ser simples o compuestos y pueden llegar a pesar hasta 20 kg (Rodríguez, 2000; Scarcelli *et al.*, 2006).

Importancia económica 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 y boniato para alimento animal y producción de almidón (Scott *et al.*, 2006).

La producción mundial de ñame en los últimos cinco años se estima en más 253.5 millones de toneladas y se siembran más de 5.5 millones de hectáreas anualmente (FAOSTAT, 2009). Debido a que este cultivo tiene una amplia gama de usos: alimentos básicos (consumo fresco y en forma procesada), alimento animal y como materia prima para fines industriales, éste cultivo se ha convertido en una fuente cada vez más importante de alimento, empleo rural y de ingreso para la creciente población de los países en desarrollo (Tamiru *et al.*, 2008).

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 más 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 (Perea, 2001; Lowell *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 de este cultivo, debido entre otras causas a la falta de material vegetal de

plantación de calidad, para incrementar los volúmenes de plantación y producción (Rodríguez, 2004).

Métodos de propagación

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

La antracnosis 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 al cultivo, 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 50.0% de la materia fresca, debido a las pudriciones. Éstas son provocadas por el ataque de diferentes 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 por nemátodos, dentro los cuales se encuentra *Scutellonema bradys* y *Pratylenchus coffeae*. Estas 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 de calidad (Amusa *et al.*, 2003).

El ñame se propaga convencionalmente a través de tubérculos enteros, secciones de tubérculos con una masa fresca que oscile entre 50 a 150 g o bulbillos aéreos (MINAG, 2008). Su principal limitante es el bajo índice de multiplicación (1:10) comparado con los cereales (1:300). El material vegetal de plantación en ocasiones constituye el 50.0% del costo de producción total del cultivo (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. Presenta como desventaja la poca homogeneidad en la brotación de éstos.

Otra vía de propagación utilizada ha sido la multiplicación de 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 de dichas secciones de tallos (Filipia y Algora, 1996).

Las técnicas de propagación convencional en este cultivo 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 microtubérculos (Perea, 2001; Balogun, 2005; Tamiru *et al.*, 2008).

El Programa Nacional de Producción de Semillas propuesto por el INIVIT, prevé aumentar paulatinamente en los próximos años la producción *in vitro* y reproducir, bajo el sistema oficial de certificación de semillas con cuatro categorías, hasta llegar a satisfacer las necesidades de material vegetal de plantación con calidad (Rodríguez, 2004).

PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE ÑAME

Métodos de propagación *in vitro*

La micropropagación fue definida como cualquier procedimiento aséptico que

comprenda la manipulación en plantas, órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plantas y permitan el desvío tanto del proceso sexual normal, como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente (Krikorian, 1991).

Establecimiento de plantas *in Vitro*

La producción de plantas *in vitro* en este cultivo ha alcanzado auge en los principales países productores (Nigeria, Costa de Marfil y República Democrática del Congo) y es empleado en sus programas nacionales de semillas para la producción inicial del material vegetal de partida (Perea, 2001; Acha *et al.*, 2004).

Además, el cultivo de meristemos ha sido utilizado para la limpieza y saneamiento del material vegetal inicial que se quiere propagar (Maurie *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 (Kozai y Kubota, 2005; Kim *et al.*, 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, así como 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 iluminación y riego, y se plantan en bolsas de polietileno que contengan compost como sustrato. En esta fase de cultivo 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 como libres de éstos.

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

La fase de multiplicación (Fase II) comprende la multiplicación 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-bencilaminopurina (6-BAP), kinetina (Kin), ancimídol (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), recomienda incrementar la intensidad luminosa con el objetivo de estimular el fortalecimiento de las plantas *in vitro*, que posteriormente serán trasplantadas al ambiente exterior.

La micropropagación concluye con la fase de aclimatación (IV). En esta las plantas 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).

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 según investigaciones, son considerados propágulos ideales para la producción de material vegetal de plantación de alta calidad.

Producción de tubérculos *in Vitro*

La producción de tubérculos *in vitro*, es una alternativa novedosa para la producción de material vegetal de plantación. (Ng y Ng, 1997; Jasik y Mantell, 2000; Balogun *et al.*, 2006).

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

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 han 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 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 la 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 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 (Jean y Cappadocia, 1992; Ng y Ng, 1997).

Para inducir la tuberización *in vitro* en ñame se han utilizado varios medios de cultivo, en su mayoría basados en modificaciones realizadas a partir del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962). Sin embargo, en todos ha sido un requisito fundamental el incremento de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo de entre 60 y 120 g.l⁻¹. Se plantea en muchos casos que la sacarosa es el factor inductor más importante que influye en este suceso (Yu *et al.*, 2000; Balogun, 2005).

En numerosos trabajos sobre ñame se ha tratado de alterar el balance interno de los reguladores de crecimiento en la planta para favorecer la tuberización, modificando las concentraciones de estos en el medio de cultivo. Se ha trabajado principalmente con 6-BAP,

Kin y Zeatina (Mantell y Hugo, 1989; Jean y Cappadocia, 1992); brasinoesteroides (Labrada *et al.*, 1997); ácido jasmónico (Bazabakana *et al.*, 2003) y retardadores del crecimiento como ancimídol y paclobutrazol (García *et al.*, 2004).

Con la finalidad de favorecer el proceso de tuberización *in vitro*, también ha sido utilizado el medio de cultivo libre de reguladores del crecimiento (Ng, 1992; Balogun *et al.*, 2004), así como el fotoperíodo (Salazar y Beltran, 2003). El manejo de todos estos factores han dado por resultado la formación de microtubérculos en ñame, los cuales varían en cuanto al número por planta, así como en la masa fresca.

Bazabakana *et al.* (2003) describieron las modificaciones morfológicas en los segmentos nodales de ñame durante la tuberización y las dividieron en cuatro fases de cultivo principales:

- La fase de cultivo I, correspondió a la presencia de al menos de una yema axilar en el segmento nodal.
- La fase de cultivo II, se desarrolló durante las dos primeras semanas de cultivo. Esta se caracteriza por la elongación de la yema axilar, precedida por un engrosamiento y alargamiento en su base, resultando la formación de una protuberancia axilar. Histológicamente, esta protuberancia resultó de la actividad de cambium extrafascicular que es el responsable del crecimiento del tubérculo. Esta fase de cultivo está referida como la primera evidencia morfológica de la formación de un microtubérculo.
- La fase de cultivo III, se caracteriza por el desarrollo de la protuberancia axilar, de la cual se forma una estructura de forma esférica similar a un microtubérculo joven. De esa protuberancia emergen raíces.
- En la Fase de cultivo IV, ocurre el engrosamiento, desarrollo y elongación de los jóvenes microtubérculos formados, y comienza la formación de una epidermis parda multiestratificada.

Aunque se han desarrollado protocolos para la producción de microtubérculos de ñame, aún no se ha podido implementar la utilización de estos como alternativa para la conservación e intercambio internacional de germoplasma, así como para la propagación masiva, debido a la baja eficiencia en cuanto al número de microtubérculos formados por

planta y a la baja masa fresca (Balogun, 2009). Takayama y Akita (2005) han considerado que los sistemas de cultivo semi-automatizados pueden ayudar a resolver estas limitantes.

AUTOMATIZACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN

Empleo de medios de cultivo líquidos. Ventajas y desventajas

Para la micropropagación del ñame se han empleado los medios de cultivo en estado semisólido y líquido (Medero *et al.*, 1999). Este último, presenta varias ventajas, como: facilidad de preparación, esterilización y manipulación, mayor rapidez en la absorción de sustancias nutritivas y en la difusión de sustancias tóxicas producidas por el metabolismo de las plantas. El empleo del medio de cultivo en estado líquido aumenta la productividad de los operarios de cabinas de flujo laminar, debido a que los explantes sólo deben ser colocados en contacto con el medio de cultivo sin necesidad de manipularlos de forma individual. Los medios de cultivo líquidos brindan grandes posibilidades para la automatización y pueden reducir los costos de producción (Preil, 2005). Sin embargo, el medio de cultivo líquido en condiciones estáticas en el cultivo *in vitro* provoca un efecto depresivo sobre el crecimiento de los tejidos, ya sea por hipoxia o por hiperhidricidad (Ziv, 2005; Preil, 2005).

La hipoxia es causada por una baja disponibilidad de oxígeno, necesario para el desarrollo de los tejidos (Jackson, 2005). La hiperhidricidad es el término empleado para caracterizar las malformaciones hiperhídricas que afectan tanto a las plantas herbáceas como a las leñosas durante su propagación vegetativa *in vitro*. Es descrita como un desorden fisiológico severo causado por la presencia de grandes cantidades de agua residual en los espacios apoplásticos de los tejidos. Las hojas y los tallos de las plantas hiperhídricas muestran una apariencia turgente y superficie acuosa, sus órganos se muestran translúcidos, menos verdes y se quiebran con facilidad (Ziv, 2005). Todo esto afecta el crecimiento de los explantes y han sido observados en varias especies de plantas (Berthouly y Etienne, 2005).

Para evitar este problema, se han desarrollado diferentes propuestas, dentro de las cuales se encuentran sistemas de control para alterar factores físicos – ambientales cerca del tejido, para la producción de menor número de plantas anormales, así como el aumento de la aeración mediante agitación o burbujeo en el medio de cultivo líquido. También, se han creado nuevos tipos de biorreactores y sistemas semi-automatizados de cultivo líquido, basados en la inmersión parcial y temporal de los explantes (Takayama y Akita 2005; Ziv, 2005; Berthouly y Etienne, 2005).

El empleo de los biorreactores fue señalado por primera vez por Takayama y Mizawa (1981) en la producción masiva de brotes de *Begonia* (*Begonia hiemalis* L.) Desde entonces, se han empleado para la producción de brotes, bulbos, microtubérculos y cormos de varias especies (Curtis, 2005).

Uno de los problemas a resolver en la propagación masiva es el alto costo de producción de plantas mediante el cultivo de tejidos (Ziv *et al.*, 2005). Ha sido señalado por Savangikar *et al.* (2005) que el empleo de la automatización reduce los costos, al disminuir el trabajo manual e incrementar los ritmos de producción. Estos autores, también han señalado que es posible, en estos tipos de sistemas de cultivo, producir plantas y microtubérculos con una mejor respuesta en la fase de aclimatización y en campo.

Sistemas de Inmersión Temporal

Desde el empleo por primera vez, de los biorreactores se ha trabajado en la búsqueda de otros sistemas de cultivo semi-automatizados más baratos y eficientes para el cultivo de materiales vegetales (Mehrotra *et al.*, 2007).

Los sistemas de cultivo de inmersión temporal, basados en la adición y remoción del medio de cultivo líquido, evitan los problemas de asfixia e hiperhidricidad, los daños mecánicos y utilizan equipamiento menos complejos (Escalona *et al.*, 2003; Jiménez, 2005). Con este tipo de sistema de cultivo también es posible lograr un aumento en la eficiencia de la micropropagación, dado por el incremento de los ritmos de producción y la calidad de los propágulos (Berthouly y Etienne, 2005). El

sistema de inmersión temporal provee a todos los explantes de un contacto con el medio de cultivo durante un período de tiempo muy corto, con una determinada frecuencia diaria. Además, estos tipos de sistemas de cultivo en comparación con los biorreactores son de fácil manejo y uso (Escalona, 2006).

A partir del principio de la inmersión temporal, han sido desarrollados numerosos sistemas de cultivo (Berthouly y Etienne, 2005). En el laboratorio Biotrop del CIRAD en Montpellier, Francia, fueron diseñados los recipientes de inmersión temporal denominados comercialmente RITA® (Teisson *et al.*, 1996), los que se han utilizado con éxito en la regeneración vía organogénesis y embriogénesis somática de numerosas especies de plantas (Berthouly y Etienne, 2005). En ellos ha sido posible multiplicar yemas axilares, segmentos nodales y microestacas, además, se han empleado para la formación de embriones a partir de callos, multiplicar embriones somáticos, así como, para lograr germinación y conversión, en especies como bananos y plátanos (*Musa* spp.), cítricos (*Citrus deliciosa* L.), café (*Coffea arabica* L.), piña (*Ananas comosus* L.) y árbol de caucho (*Hevea brasiliensis* L.). Estos recipientes de inmersión temporal han resultado ser más útiles para los procesos embriogénicos, pues para la organogénesis se requiere de recipientes de mayor tamaño (Escalona, 2006).

En los SIT intervienen una serie de factores físicos, mecánicos y ambientales que posibilitan obtener una mejor respuesta fisiológica y lograr una mayor eficiencia en el cultivo con respecto a los medios de cultivo líquidos estáticos (Escalona *et al.*, 2007). El tiempo y frecuencia de inmersión tienen gran importancia, tanto para la asimilación de los nutrientes por los explantes, como en la renovación de la atmósfera interna del recipiente de cultivo. Un manejo correcto del tiempo y frecuencia de inmersión en los SIT, ha ayudado a controlar la hiperhidricidad que puede aparecer en los explantes desarrollados en inmersión constante con el medio de cultivo líquido estático (Escalona, 2003; McAlister *et al.*, 2005).

La densidad de explantes por frasco de cultivo, así como el volumen de medio de cultivo por explante, son otros de los factores a tener presente para lograr la eficacia con el uso de

los SIT (Berthouly y Etienne, 2005; Hempfling y Preil, 2005). El número de explantes que se coloca por cada frasco de cultivo tiene efecto sobre el desarrollo morfofisiológico de los materiales vegetales. El manejo de la densidad de explantes permite definir el aprovechamiento del volumen del frasco de cultivo, así como la capacidad productiva en las cámaras de crecimiento (Tisserat y Silman, 2000; Jiménez, 2005).

El control del medio de cultivo por explante permite establecer un equilibrio entre la asimilación de nutrientes por el explante y la secreción de compuestos al medio de cultivo provenientes de éstos (Hahn y Paek, 2005).

En cada protocolo que se desarrolle con los SIT es necesario ajustar cada uno de estos parámetros, pues pueden variar en dependencia del cultivo, variedad y sistema de regeneración que se emplee (Berthouly y Etienne, 2005).

Producción de microtubérculos en sistemas de cultivo automatizados

Los sistemas de cultivo automatizados presentan ventajas en comparación con el sistema de cultivo donde se emplea medio de cultivo líquido estático, tradicionalmente usado para la producción de microtubérculos. Estas se pueden resumir en mayor facilidad de escalado en este tipo de sistema de cultivo, el contacto del material vegetal con el medio de cultivo y la aeración forzada del medio de cultivo estimula la tasa de crecimiento e incrementa la biomasa de los microtubérculos. Además, es posible en los sistemas automatizados de cultivo realizar un control más preciso del suministro de nutrientes y de otros factores asociados con la tuberización (Takayama y Akita, 2005).

En el cultivo de la papa se han empleado diversos sistemas de cultivo automatizados y se han desarrollado varios protocolos de trabajo para la producción de microtubérculos. Por ejemplo, Akita y Takayama (1994) crearon un biorreactor simple con agitación en el medio de cultivo para la formación de microtubérculos de papa. Estos autores describieron la formación de los microtubérculos en dos fases de cultivo: primero ocurrió el crecimiento de los brotes, y luego la inducción y formación de

microtubérculos, mediante la manipulación de factores físicos, microambientales y químicos. En esta fase emplearon un sistema de control semicontinuo del nivel del medio de cultivo y transfirieron el medio de cultivo del vaso de reserva al vaso de cultivo cada seis horas y lo retiraron a la hora, lo que permitió que todos los explantes fueran sumergidos completamente a intervalos. De esta forma se logró incrementar el número de microtubérculos formados por brotes. Estos ensayos les permitieron determinar que la respuesta en relación con la tuberización, es diferente en cultivos con el biorreactor en comparación con el cultivo en medios líquidos estáticos.

Más adelante, Akita y Ohta (1998) desarrollaron un sistema de cultivo simple y barato con el empleo de un biorreactor sin aeración forzada. Los explantes fueron colocados sobre un soporte de poliuretano para su cultivo durante la fase de crecimiento. Luego de un mes, el medio de cultivo fue reemplazado por el medio de cultivo inductor de la tuberización, con 90.0 g.l⁻¹ de sacarosa. El vaso de cultivo fue colocado en un cilindro plástico, el cual fue continuamente rotado a 1.0 rpm durante el período de duración de esta segunda fase de cultivo (tres meses). El número y masa fresca total de los microtubérculos se incrementó en 1.45 y 2.43 unidades comparado con el cultivo sin rotación.

Por su parte, Teisson y Alvard (1999), evaluaron la producción de microtubérculos en tres cultivares de papa (Bintje, Ostara y Desirée), en un sistema nombrado "Doble RITA®", que consistía en dos frascos de cultivo tipo RITA® de un litro de capacidad, uno como reservorio de medio de cultivo y otro para el cultivo de los explantes, en ellos obtuvieron a las 10 semanas de cultivo 1.5, 2.3 y 1.4 microtubérculos por planta en cada genotipo. El 50.0% de los microtubérculos obtenidos en este tipo de sistema de cultivo presentaron una masa fresca superior a 0.5 g.

Por su parte, Jiménez *et al.* (1999) desarrollaron un protocolo para la producción de microtubérculos de papa en SIT con un frasco de cultivo de cuatro litros de capacidad. En el SIT con un tiempo de inmersión de cinco minutos cada tres horas la tuberización *in vitro* ocurrió en un mayor número de yemas axilares

de la planta y se obtuvo un promedio de microtubérculos por explante para la variedad 'Dessiré' de 2.8 y para 'Atlantic' de 3.1 después de nueve semanas de cultivo. El tamaño y la masa fresca de los microtubérculos fueron superiores a los obtenidos en medio de cultivo semisólido.

En este mismo cultivo, Ziv (2000) empleó un biorreactor muy barato para la proliferación de brotes y para obtener microtubérculos. Estuvo diseñado con una configuración cónica con un puerto de inoculación y cosecha, y con accesorios de usos múltiples. La agitación del medio de cultivo se realizó mediante flujo de aire y los brotes obtenidos después de 30 días de cultivo desarrollaron hasta 30 y 32 yemas axilares. Luego se sustituyó el medio de cultivo de crecimiento por el medio de cultivo de inducción de la tuberización y a las diez semanas de cultivo, se obtuvo por cada 10.0 gMF colocada, hasta 36 microtubérculos. Estos presentaron una masa fresca que osciló entre 0.392 – 0.672 g.

Igualmente, Yu *et al.* (2000) informaron la producción de microtubérculos de papa en un biorreactor rotatorio. Al reemplazar el 75.0% del medio de cultivo cada dos semanas de cultivo, lograron aumentar el número de microtubérculos con una masa fresca superior a 1.0 g en comparación con el tratamiento donde no se reemplazó el medio de cultivo. Estos investigadores demostraron que mantener la concentración de sacarosa en el medio de cultivo es el principal factor a tener en consideración para obtener, en el biorreactor, microtubérculos de papa de mayor masa fresca.

Con el uso de SIT, Pérez (2001), obtuvo los mejores resultados para la tuberización *in vitro* de la papa, con el empleo de un tiempo de inmersión de dos minutos y con una frecuencia cada seis horas. Los microtubérculos se caracterizaron por presentar una masa fresca de 0.98 g y diez milímetros de diámetro.

En el SIT se conjugan factores que permiten la renovación de la atmósfera, un aporte más eficiente de elementos nutritivos, la eliminación de sustancias tóxicas, así como un mejor intercambio gaseoso (Teisson *et al.*, 1996; Berthouly y Etienne, 2005). Estas condiciones provocan en las plantas de papa un mayor

desarrollo de yemas axilares durante el crecimiento, requisito indispensable para la formación posterior de microtubérculos, además de cambios fisiológicos favorables al proceso de tuberización *in vitro*. La estimulación en las yemas axilares inducidas por el SIT, provoca una mayor formación de microtubérculos, así como un aumento considerable en la calidad, expresada en masa fresca en relación con sistema de cultivo de propagación *in vitro* convencional (Jiménez, 2005).

Según Preil (2005) los nuevos desarrollos en análisis de imagen, robot, biorreactores, máquinas de encapsulación y un mejor control de la atmósfera interna en los recipientes de cultivo, pueden contribuir a mejorar los sistemas automatizados para el cultivo de tejidos de plantas en el futuro.

En el cultivo del ñame, Salazar y Hoyos (2007), informaron la multiplicación y tuberización en SIT tipo RITA®. Ellos se limitaron a evaluar el efecto del tiempo y la frecuencia de inmersión, así como, la densidad de explantes por frasco de cultivo sobre la tasa de multiplicación. Estos investigadores obtuvieron como resultados que con un tiempo de inmersión de 10 minutos cada ocho horas se obtenía la formación de mayor número de entrenudos y mayor tamaño de las plantas a las cuatro semanas de cultivo. Sin previo estudio utilizaron ese mismo tiempo y frecuencia de inmersión para la formación de los microtubérculos. En cuanto a la densidad de explantes que evaluaron no se detectaron diferencias significativas para la multiplicación de los segmentos nodales y la formación de los microtubérculos, solo lograron obtener como promedio 0.85 microtubérculos por planta, con una masa fresca promedio de 0.24 g que no pudieron ser empleados como material vegetal de plantación en campo.

Por todo ello, se hace necesario trabajar en el desarrollo de protocolos para la formación de microtubérculos de ñame en sistemas de inmersión temporal que utilicen frascos de cultivo de mayor capacidad, en los cuales mediante la evaluación de variables fisiológicas y el conocimiento del contenido de los nutrientes del medio de cultivo por fase de cultivo, sea posible incrementar el número de microtubérculos formados por planta, así como producir microtubérculos con una masa fresca

que permita su plantación directamente en condiciones de campo.

Cabrera (2009) desarrollaron un protocolo para la formación de microtubérculos de ñame clon 'Pacala Duclos' en sistema de inmersión temporal conformado por frasco de cultivo de 10 L de capacidad. Ellos lograron la mayor formación de microtubérculos aprovechables como material vegetal de propagación con un tiempo de inmersión de 15 minutos cada seis horas y con el empleo de un volumen de 60 ml de medio de cultivo por planta *in vitro*.

EMPLEO DE MICROTUBÉRCULOS COMO MATERIAL VEGETAL DE PLANTACIÓN EN CAMPO

Balogun (2009), señaló que para el uso de los microtubérculos de ñame en la conservación e intercambio de germoplasma, así como para la propagación, es necesario desarrollar protocolos que permitan la producción de microtubérculos con una masa fresca que posibilite reducir el período de dormancia, y permita el desarrollo post-brotación. Este investigador se refirió, a que las futuras investigaciones deben estar dirigidas a conocer la posible variación genética en las plantas obtenidas de los microtubérculos, en términos de conocer su aplicabilidad para la conservación de germoplasma y para la propagación. También, señaló que es necesario conocer sobre el vigor de las plantas en campo y sus posibilidades para la plantación directa en estas condiciones. Además, se debe investigar sobre el número de generaciones que se necesitarían para que los microtubérculos produzcan tubérculos comparables a los tubérculos 'semillas'. Otro aspecto será, conocer la supervivencia de las plantas de los microtubérculos en comparación con las plantas *in vitro*. Así como, los beneficios económicos de la conservación y de la propagación a partir de los microtubérculos. Hasta el presente existen escasas investigaciones sobre la respuesta de los microtubérculos de ñame en condiciones de campo.

En relación con el cultivo de la papa, Ranalli (1997) ha señalado que el tamaño y masa fresca de los microtubérculos está correlacionado con la duración del período de dormancia. Según este investigador, los tubérculos pequeños, menores de 0.5 gMF,

experimentaron deshidratación cuando fueron almacenados por un período de tiempo prolongado. En la investigación realizada por este autor se plantaron en campo, microtubérculos con una masa fresca superior a 0.25 g, los que brotaron lentamente debido a la poca cantidad de sustancias de reservas. En ellos sólo emergió un tallo por planta, el cual luego se ramificó. Las plantas de estos microtubérculos desarrollaron un escaso sistema radicular. El poco desarrollo foliar de las plantas de los microtubérculos, limitó la cantidad de radiación solar que puede ser interceptada y disminuyó el crecimiento y la producción de materia seca. Esto provocó la obtención de bajos rendimientos en las plantas procedentes de microtubérculos en comparación con los tubérculos 'semillas', aspecto que limitó su incorporación en los programas de producción de semillas por métodos biotecnológicos (Kawakami *et al.*, 2005).

El tamaño y la masa fresca de los microtubérculos destinados para la plantación en campo determina en gran medida la respuesta de los mismos bajo esas condiciones de cultivo. Yu *et al.* (2000) han señalado que se requieren protocolos que produzcan microtubérculos que presenten como mínimo una masa fresca de 0.5 g para que puedan ser utilizados en los programas de producción de semillas de papa.

Peréz (2001), plantó directo a campo los microtubérculos de papa provenientes del SIT. Estos presentaban una masa fresca promedio de 1.26 g y un diámetro promedio de 11.40 mm. Las plantas que se obtuvieron de los microtubérculos mostraron una mayor altura y número de tallos por planta en comparación con las plantas procedentes de la micropropagación. Luego de cosechados ambos tratamientos, no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de microtubérculos por planta. Sin embargo, las plantas procedentes de los microtubérculos presentaron valores superiores en cuanto al peso y diámetro de los tubérculos producidos.

La formación de microtubérculos en el cultivo del ñame constituye una valiosa alternativa para la propagación de esta especie. Sin embargo, los protocolos desarrollados hasta el presente no pueden ser aplicados a escala comercial, debido fundamentalmente al bajo número de

microtubérculos formados por brote, así como porque los microtubérculos formados se han caracterizado por una masa fresca inferior a 0.5 g, lo cual ha limitado el empleo de estos para la plantación directa en condiciones de campo, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas.

El empleo de sistemas de cultivo semi-automatizado puede constituir una alternativa de gran interés para la formación de microtubérculos de ñame que permita emplearlos como material vegetal de plantación directo en campo.

REFERENCIAS

- Acha IA, Shiwashi H, Asiedu R, Akoroda MO (2004) Effect of auxins on root development in yam (*Dioscorea rotundata*) vine. *Tropical Science* 44 (2): 113-119
- Akita M, Takayama S (1994) Induction and development of potato tubers in jar fermentor. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36: 177-182
- Akita M y Ohta Y (1998) A simple method for mass propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.) using a bioreactor without forced aeration. *Plant Cell Reports* 18: 284-287
- Amusa N, Adegbite A, Amuhameda S, Baiyewu RA (2003) Yam diseases and its management in Nigeria. *African Journal of Biotechnology* 2 (12): 497-502
- 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.
- Balogun MO, Fawole I, Ng SYC, Ng Q, Shiwachi H, Kikuno H (2006) Interaction among cultural factors in microtuberization of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir). *Tropical Science* 46 (1): 55-59
- 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
- Bazabakana R, Wattiez R, Baucher M, Diallo B, Jaziri M (2003) Effect of jasmonic acid on developmental morphology during *in vitro* tuberization of *Dioscorea alata* (L.). *Plant Growth Regulation* 40: 229-237
- Berthouly M, Etienne H (2005) Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide A K y Preil W (Eds). *Liquid Culture Systems or in vitro Plant Propagation*. pp. 165-195. Springer. Dordrecht
- 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 J, Kosky RG, Rayas C, De Feria M, López T, Basail P, Medero V (2009) Protocolo para la formación de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. *Revista Colombiana de Biotecnología* XI (2): 19-30
- 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
- Curtis WR (2005) Application of bioreactor design principles to plant Micropropagation. En: AK Hvoslef-Eide y W Preil (Eds.). *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, pp. 21-40. Springer. Dordrecht
- Escalona M, Samaon G, Borroto C, Desjardins Y (2003) Physiology of effects of temporary immersion bioreactors on micropropagated pineapple plantlets. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 39: 651-656
- Escalona, M (2006) Temporary immersion beats traditional techniques on all fronts. *Prophyta annual*: 48-50
- Escalona M, Aragón C, Capote I, Pina D, Cejas I, Rodríguez R, Cañal M, Sandoval J, Roels S, Debergh P, Desjardins Y, González-Olmedo J (2007) Physiology of effects of temporary immersion bioreactor (TIB) on micropropagated plantlets. *Acta Hort.* 748: 95-101
- Filipia R, Algora P (1996) Métodos de reproducción acelerada de semilla de ñame. En: XXX Aniversario del INIVIT. Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Santo Domingo, Cuba
- Forsyth C, Van Staden J (1984) Tuberization of *Dioscorea bulbifera* stem nodes in culture. *J. Plant Physiol* 115: 79-83
- 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. *Biotecnología Vegetal* 4 (4): 184-187
- 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.
- Hahn EJ, Paek KY (2005) Multiplication of Chrysanthemum shoots in bioreactors as affected by culture method and inoculation density of single node stems. En: AK Hvoslef-Eide y W Preil (Eds.), Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 143–153. Springer. Dordrecht
- Hempfling T, Preil W (2005) Application of a temporary immersion system in mass propagation of *Phalaenopsis*. En: AK Hvoslef-Eide y W Preil (Eds.), Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 231–242. Springer. Dordrecht
- 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
- Jackson MB (2005) Aeration stress in plant tissue cultures. En: AK Hvoslef-Eide y W. Preil (Eds.), Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 459–473. Springer. Dordrecht
- Janssens M (2001) Yam. En: Raemaekers R (Eds). Crop production in tropical Africa. pp. 229-245. Falta editorial
- 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
- Jean M, Cappadocia M (1992) Effects of some growth regulators on *in vitro* tuberization in *Dioscorea alata* L. 'Brazo fuerte' and *D. abyssinica* Hoch. Plant Cell Reports 11: 34-38
- Jiménez E, Pérez N, De Feria M, Barbón R, Capote A, Chávez M, Quijala E, Pérez JC (1999) Improved production of potato microtubers using a temporary immersion system. Plant Cell Tissue and Organ Culture 59: 19-23
- Jiménez E (2005) Mass propagation of tropical crops in temporary immersion systems. En: Hvoslef-Eide A K y Preil W (Eds). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation, pp. 197-211. Springer. Dordrecht
- Kawakami J, Iwama K, Hasegawa T, Jitsuyama Y (2003) Growth and Yield of Potato Plants Grown from Microtubers in Fields. Amer. J. of Potato Res 80: 371-378
- 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 & Biotechnology 79 (5): 818-822
- Kozai T, Kubota C (2005) Unit and terminology use for the studies of photoautotrophic micropropagation. En: T Kozai, F Afreen, SMA Zobayed (Eds). Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new propagation and transplant production system, pp. 6-17. Springer. Dordrecht
- Krikorian A (1991) Medios de cultivos: Generalización, composición y preparación. En: Roca, W y L Mroginski (Eds). Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones, pp. 41-79. CIAP, Cali
- Labrada M, Millán A, Cruz G (1997) Influencia de los brasinosteroides en la tuberización *in vitro* del ñame (*Dioscorea alata* L.). Centro Agrícola 20 (1): 80-81
- Lebas BSM (2002) Diversity of viroses 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.
- Lowell, L, Dilworth F, Omoruyi P, Helen N (2007) *In vitro* availability of some essential minerals in commonly eaten processed and unprocessed Caribbean tuber crops. Biometals 20 (1): 37-42
- 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
- Mantell S, Hugo A (1989) Effect of photoperiod mineral medium strength, inorganic ammonium, sucrose and cytokinina on root, shoot and microtuber development in shoot cultures of *Dioscorea alata* L. and *D. bulbifera* L. yams. Plant Cell Tissue and Organ Culture 16: 23-39
- Mbanaso, ENA, Chukwu LI, Opara MUA (2007) *In vitro* basal and nodal microtuberization in yam shoot cultures (*Dioscorea rotundata* Poir, cv. Obiaoturugo) under nutritional stress conditions. African Journal of Biotechnology 6 (21): 2444-2446

- McAlister, B, Finnie J, Watt MP y Blakeway F (2005) Use of the temporary immersion bioreactor system (RITA®) for production of commercial *Eucalyptus* clones in Mondi Forests (SA). En: AK Hvoslef-Eide y W Preil (Eds.). Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 425–442. Springer. Dordrecht
- 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 pp. 12
- Mehrotra, S, Manoj G, Arun K, Bhartendu M (2007) Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. African Journal of Biotechnology 6 (13): 1484-1492
- Milián, M, Girado Y, Beovides Y, Lago M, Hernández J, Ruiz E (2005) The germplasm bank an alternative to preserve the biodiversity. Revista Internacional Agrisost 12 (1): 20-28
- 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 bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15: 473-497
- Ng SYC (1992) Micropropagation of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) Biotechnology in Agriculture and Forestry 19: 136-159
- Ng SYC, Ng NQ (1997) Germplasm conservation in food yams (*Dioscorea* spp.): Constraints, Application and Future prospects. En: Razdan MK, Cocking EC. U.A (Eds) conservation of plant Genetic resources *in vitro*. Volume 1: General Aspects, pp. 257-286. Science publishers Inc. New York
- Ovono PO, Kevers C, Dommès J (2007) Axillary proliferation and tuberization of *Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex. Plant Cell Tissue and Organ Culture 91: 107-114
- Pathirana, R, Harris J, Marian J, McKenzie M (2008) A comparison of microtubers and field-grown tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.) for hexoses, sucrose and their ratios following postharvest cold storage. Postharvest Biology and Technology 49 (1): 180-184
- 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
- Perea M (2001) Contribución de la biotecnología al desarrollo sostenible del cultivo del ñame. En: Perea, M. (Eds). Biotecnología Agrícola. pp. 289-301. Bogotá, D.C.
- 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.
- Piao XC, Chakrabarty D, Hahn EJ, Paek KY (2003) A simple method for mass production of potato microtubers using a bioreactor system. Current Science 84 (8): 1129-1132
- Preil W (2005) General introduction: a personal reflection on the use of liquid media for *in vitro* culture. En: AK Hvoslef-Eide y W Preil (Eds.). Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 1–18. Springer. Dordrecht
- 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 W (2000) Botánica, domesticación y fisiología del cultivo del ñame (*Dioscorea alata*). Agronomía Mesoamericana 11 (2): 133-152
- 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
- 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 RD, Beltran JDH (2003) Microtuberización en ñame (*Dioscorea alata* L.) var. 'Pico de botella'. Revista Colombiana de Biotecnología 4 (2): 27-32
- Salazar D, Hoyos S (2007) Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 60 (2): 3907-3921
- Sarkar D (2008) The signal transductions pathways controlling in plant tuberizations in potato: an emerging synthesis. Plant Cell Reports 27: 1-8

- Savangikar VA, Savangikar C, Daga RS, Pathak S (2005) Potentials for cost reduction in a new model of commercial micropropagation. En: AK Hvoslef-Eide y W Preil (Eds.). Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 403–414. Springer. Dordrecht
- Scarcelli N, Tostain S, Mariac C, Agbangla C, Da O, Berthaud J, Pham J (2006) Genetic nature of yams (*Dioscorea* sp.) domesticated by farmers in Benin (West Africa). Genetic Resources and Crop Evolution 53: 121–130
- 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)
- Takayama S, Misawa M (1981) Mass propagation of *Begonia hiemalis* plantlets by shake culture. Plant Cell Physiol. 22: 462-467
- Takayama S, Akita M (2005) Practical aspects of bioreactor application in mass propagation of plants. En: AK Hvoslef-Eide y W Preil (Eds.). Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation, pp. 61–78. Springer. Dordrecht
- 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
- Teisson C, Alvard D (1999) *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. Potato Research 42: 499-504
- Teisson, C, Alvard D, Berthouly M, Cote F, Escalant J, Etienne H, Lartand M (1996) Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. Acta Hort. 440: 521-526
- Tisserat B, Silman R (2000) Interaction of cultures vessels, media volume, culture density, and carbon dioxide levels on lettuce and spearmint shoot growth *in vitro*. Plant Cell Reports 19: 464-471
- Vaillant V, Bade P, Constant C (2005) Photoperiod affects the growth and development of yam plantlets obtained by *in vitro* propagation. Biologia Plantarum 49 (3): 355-359
- Wilson JE (1989) Rapid multiplication of yams (*Dioscorea* spp.). Institute for Research, Extension and Training in Agriculture. IRETA Publication
- Yu W, Joyce P, Cameron D, McCown B (2000) Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. Plant Cell Reports 19: 407-413
- Ziv M (2000) Bioreactor technology for plant micropropagation. Horticultural reviews 24, Edited by Jules Janick
- Ziv M (2005) Simple bioreactor for mass propagation of plants. En: Hvoslef-Eide AK y Preil W (Eds.). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation, pp. 79-93. Springer. Dordrecht