

## Efecto de la distancia de plantación de plantas *in vitro* sobre la producción de minitubérculos de *Dioscorea rotundata* Point cv. 'Blanco de Guinea' en casa de cultivo

Daniel Rodríguez Pérez<sup>1\*</sup>, Rafael Gómez-Kosky<sup>2</sup>, Víctor Medero Vega<sup>1</sup>, Yoel Beovides García<sup>1</sup>, Manuel Cabrera Jova<sup>1</sup>, Diosdada Gálvez Guerra<sup>1</sup>, Yunier Rodríguez García<sup>1</sup>, Ania Robaina Jiménez<sup>1</sup>.  
\*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apartado 6, Santo Domingo, Villa Clara, Cuba. CP 53 000

<sup>2</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830 e-mail: aclimat.biotec@inivit.cu

### RESUMEN

Ante la poca disponibilidad de material vegetal de plantación en ñame cv. 'Blanco de Guinea' (*Dioscorea rotundata* Point), debida fundamentalmente a que los tubérculos que se consumen son los utilizados como semilla, se han desarrollado metodologías para su micropropagación. Sin embargo, la supervivencia en campo de las plantas obtenidas es muy baja, por lo que es necesario la búsqueda de otras alternativas, entre ellas la producción de minitubérculos. Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de la distancia de plantación de las plantas *in vitro* en condiciones de casa de cultivo sobre la producción de minitubérculos. Se estudiaron cuatro distancias de plantación de las plantas *in vitro* (0.05x0.05 m, 0.10x0.10 m, 0.15x0.15 m, 0.20x0.20 m) y para cada una se determinó: número de minitubérculos, masa fresca de tubérculos por planta y su categoría como material de plantación. Los valores más elevados de número de tubérculos por planta (3.83 y 3.12) se obtuvieron con las distancias de 0.10 x 0.10 m y 0.15 x 0.15 m, respectivamente. Con 0.10 x 0.10m se lograron los más altos números de minitubérculos por metro cuadrado: 100, 110 y 90 en las categorías con una masa fresca entre 16.0 a 25.9 g, 26.0 a 35.9 g y 36.0 a 50.0 g (26.10%, 28.72% y 23.49%, respectivamente). Estos resultados, que se obtienen por primera vez en este cultivo, confirman la utilidad de producir minitubérculos en casa de cultivo a partir de plantas *in vitro* de ñame como una alternativa para obtener material vegetal de plantación.

Palabras clave: casa de cultivo, ñame, semilla, tubérculos

## Effect of planting distance of *in vitro* plants on *Dioscorea rotundata* Point cv. 'White Guinea' minituber production in greenhouse

### ABSTRACT

Considering the limited availability of planting material in yam cv. 'White Guinea' (*Dioscorea rotundata* Point), mainly due to the tubers that are consumed are used as seed, have been developed methods for its micropropagation. However, field survival of the plants is very low, so the search of alternatives, among them, the production of minitubers, are necessities. This work aimed to determine the effect of planting distance of the *in vitro* plants in green house on minitubers production. Four planting distances of *in vitro* plants (0.05x0.05 m, 0.10x0.10 m, 0.15x0.15 m, 0.20x0.20 m) were studied. In each treatment was determined: number of minitubers, fresh mass of tubers per plant and its category as planting material. The highest values of number of tubers per plant (3.83 and 3.12) were obtained with the distance x 0.10 0.10 x 0.15 m and 0.15 m, respectively. With the planting distance of 0.10 x 0.10m, the higher numbers of minitubers per square meter were achieved: 100, 110 and 90 in the categories with a fresh mass between 16.0 to 25.9 g, 26.0 to 35.9 g, 36.0 to 50.0 g (26.10%, 28.72% and 23.49%, respectively). These results, obtained for the first time in this crop, confirm the usefulness of minitubers production in greenhouse from *in vitro* plants of yam as an alternative to obtain planting material.

Keywords: greenhouses, seed, tuber, yams

### INTRODUCCIÓN

*Dioscorea rotundata* Poir (ñame) es originaria de África Occidental y constituye una excelente

f fuente de carbohidratos (Tamiru *et al.*, 2008). En Cuba, su producción ha ayudado a la diversidad y estabilidad alimentaria. Tradicionalmente este ha constituido una fuente

importante de ingresos y empleos en las regiones oriental y central del país (Rodríguez, 2006). No obstante, su desarrollo extensivo ha estado limitado, entre otras causas, por la poca disponibilidad de material vegetal de plantación con adecuada calidad fisiológica y sanitaria (Rodríguez, 2004). Esto se debe, fundamentalmente, a que los tubérculos, que constituyen la parte útil de la planta para la alimentación, también tienen que ser utilizados como material vegetal de plantación.

El ñame cv. 'Blanco de Guinea' se caracteriza por su adaptabilidad a las condiciones edafoclimáticas de las principales áreas agrícolas en el país, tiene alto valor nutritivo y aceptación por la población para su consumo fresco y en forma procesada (MINAG, 2008).

De forma convencional, el ñame se propaga a través de tubérculos enteros, secciones de estos con una masa fresca que oscile de 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% del costo de producción total (Balogun, 2009) y es la principal limitación para desarrollar el cultivo (Yan *et al.*, 2011).

La biotecnología ofrece ventajas para lograr altos índices de multiplicación en varios cultivos. Para ñame se han desarrollado protocolos de propagación *in vitro* con el fin de su introducción en las biofábricas en Cuba. Ello ha permitido contar con material vegetal de partida para iniciar programas de producción de semillas de calidad en este cultivo. Tales investigaciones demostraron que la producción de minitubérculos como material vegetal de plantación directo a campo ofrece ventajas en comparación con las plantas *in vitro* (Cabrera *et al.*, 2012) y también respecto a los microtubérculos (Cabrera *et al.*, 2011; Olivier *et al.*, 2012).

Onovo *et al.* (2010) consideraron que los microtubérculos de mayor tamaño brotan más rápido debido a que tienen mayor cantidad de sustancias de reserva. En ñame se han obtenido microtubérculos con una masa de hasta poco más de 0.3 g utilizando ácido jasmónico a 2.5  $\mu$ M, y su germinación fue del 55% para aquellos con masa fresca

superior a 0.15 g. No obstante, se ha demostrado que la propagación del ñame mediante microtubérculos es un proceso largo, tedioso e ineficiente (Olivier *et al.*, 2012).

No abundan las referencias científicas sobre cuál debe ser el manejo de las plantas producidas *in vitro* para lograr una mayor eficiencia en la producción de minitubérculos en ñame. Eso implica que sea necesario conocer cómo y dónde plantarlas para lograr la mayor producción de minitubérculos con calidad para ser utilizados como material de plantación directa en campo. Así se lograría reducir el uso de los tubérculos comerciales a utilizar como semilla para la nueva plantación.

El presente trabajo se propuso el objetivo de determinar el efecto de la distancia de plantación de las plantas producidas *in vitro* sobre la producción de minitubérculos para utilizarlos como semilla en condiciones de campo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en Santo Domingo, Villa Clara, Cuba, durante el período comprendido entre septiembre del 2009 y mayo del 2012.

### *Material vegetal*

Se utilizaron tubérculos de ñame cv. 'Blanco de Guinea' procedentes del Banco de Germoplasma del INIVIT. Los tubérculos fueron previamente seleccionados por sus características morfológicas según la lista de descriptores para la especie (IPGRI/IITA, 1997) y adecuada sanidad. El diagnóstico a enfermedades virales se realizó en el Laboratorio de Manejo de Plagas del INIVIT.

Para la obtención de las plantas *in vitro* y su aclimatización se siguió el protocolo descrito por Cabrera *et al.* (2008).

### *Condiciones de cultivo*

Las plantas producidas *in vitro* procedentes de la fase de enraizamiento y con una longitud entre 3.0 y 5.9 cm se transfirieron a cámaras de 1.0 x 20.0 x 0.20 m bajo condiciones semicontroladas (casa de cultivo) que incluyen

un cobertor con malla antiáfidos y una tipo Sarán que regula la intensidad luminosa en un 10%. El sustrato estuvo conformado por un 50% de suelo y 50% de materia orgánica (cachaza descompuesta).

El riego se efectuó con un sistema *Microjet*, con una frecuencia de riego de 10 minutos cada 12 horas durante los primeros 30 días de cultivo, luego se aplicó un riego de 15 minutos cada día hasta dos semanas antes de efectuarse la cosecha. Las atenciones culturales incluyeron la limpia manual de malas hierbas y aplicaciones de fungicidas cada 15 días.

### Efecto de la distancia de plantación

Se ensayaron cuatro distancias de plantación: 0.05 x 0.05m, 0.10 x 0.10m, 0.15 x 0.15m y 0.20 x 0.20m. Se empleó un diseño de bloques al azar con tres réplicas y el experimento se repitió tres veces.

La cosecha de los minitubérculos se realizó en el mes de febrero después de 32 semanas de cultivo, de forma manual y se evaluó por cada tratamiento: el número de minitubérculos producidos por planta y la masa fresca de ellos (g). Además, se determinó por cada distancia de plantación el número de minitubérculos obtenidos por m<sup>2</sup>.

En cada uno de los tratamientos, el número total de minitubérculos obtenidos por m<sup>2</sup> se clasificó según la masa fresca en las categorías

siguientes: 5.0 a 15.9g, 16.0 a 25.9g, 26.0 a 35.9g, 36.0 a 50.0g y más de 50.0g.

### Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete de programas SPSS versión 15.0. Los datos se sometieron a las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas y luego los datos relativos al número de minitubérculos por planta, número de minitubérculos por metro cuadrado (m<sup>2</sup>) y número de minitubérculos clasificados por masa fresca se analizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis. A la masa fresca de los minitubérculos se le realizó un análisis de varianza simple y se empleó la prueba de Tukey para comparar las medias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto de la distancia de plantación

La distancia de plantación de las plantas *in vitro* influyó en el número y en la masa fresca de los minitubérculos producidos por planta. Cuando se plantaron a una distancia de 0.10 x 0.10m y 0.15 x 0.15m se obtuvieron los mayores valores de número de tubérculos por planta (3.83 y 3.12, respectivamente) sin diferencias significativas entre ellas, pero sí con respecto al resto de las variantes (Tabla 1). Sin embargo, en cuanto a la masa fresca de los minitubérculos por planta, a la mayor distancia de las estudiadas, 0.20 x 0.20m, se alcanzó el mayor valor con diferencias significativas con los restantes tratamientos evaluados (Tabla 2).

Tabla 1. Efecto de la distancia de plantación de plantas *in vitro* de ñame cv. 'Blanco de Guinea' sobre la producción de minitubérculos.

Distancia de plantación (m)	Número de minitubérculos por planta	
	Media	Media de rango
0.05 x 0.05	1.42	45.67 b
0.10 x 0.10	3.83	73.12 a
0.15 x 0.15	3.12	67.89 a
0.20 x 0.20	1.23	41.23 b

*Medias de rangos con letras no comunes para el número de minitubérculos por planta difieren según prueba de Kruskal Wallis para  $p < 0.05$  y Medias con letras no comunes para la masa fresca de los minitubérculos difieren según prueba de Tukey para  $p < 0.05$ .*

Tabla 2. Efecto de la distancia de plantación de plantas *in vitro* de ñame cv. 'Blanco de Guinea' sobre la masa fresca de los minitubérculos.

Distancia de plantación (m)	Masa fresca (g)
0.05 x 0.05	20.30 d
0.10 x 0.10	45.56 c
0.15 x 0.15	75.34 b
0.20 x 0.20	100.12 a
ES ±	0.17

Medias con letras no comunes para la masa fresca de los minitubérculos difieren según prueba de Tukey para  $p < 0.05$ .

La distancia de plantación de las plantas *in vitro* influyó, además, en el número total de minitubérculos por m<sup>2</sup>. En la menor 0.05 x 0.05m se obtuvo el mayor número de minitubérculos por m<sup>2</sup> y en la medida que se fue espaciando la distancia de plantación fue disminuyendo el número por m<sup>2</sup> (Figura 1). El mayor número de plantas por m<sup>2</sup> en la distancia de 0.5x0.5 m incrementó significativamente el número de minitubérculos por planta (514) pero el 84.43% de estos se encontraron en la categoría de menor masa fresca (5.0 a 15.9 g) (Figuras 1 y 2).

Aunque el objetivo fue determinar la distancia de plantación en la cual se obtenía el mayor número de minitubérculos en la casa de cultivo a partir de las plantas *in vitro*, también fue necesario clasificar los minitubérculos por su masa fresca como indicador de calidad. Según el instructivo técnico del cultivo del ñame (MINAG, 2008), la masa fresca de la semilla de ñame determina en gran medida su repuesta en campo. En esta investigación, la distancia de plantación de las plantas *in vitro* influyó en el número de minitubérculos en cada categoría (Figura 2) según la masa fresca.

Según el instructivo técnico para la producción de semillas (INIVIT, 2012), en la multiplicación convencional del ñame se recomienda utilizar coronas de tubérculos (extremo apical) y secciones de ellos (parte central). La parte basal también puede usarse en campos de producción. En todos los casos las fracciones deben tener un peso entre 125 y 200 g, lo cual implica que al menos, entre el 30 y 40% de la producción deba utilizarse como semilla.

Cuando se empleó una distancia de plantación de 0.05 x 0.05m, se produjeron 514 minitubérculos por m<sup>2</sup>, y el mayor número de ellos (434) se encontraron en la categoría de masa fresca entre 5.0 a 15.9 g para un 84.43%. Con esta distancia de plantación no se obtuvieron minitubérculos con una masa fresca superior a 50.0g (Figura 3).

Sin embargo, con las distancias de plantación superiores se incrementó el número de minitubérculos mayores de 16 g. Así por ejemplo, con 0.10 x 0.10m se obtuvieron los más altos valores de número de minitubérculos en las categorías con una masa fresca de 16.0 a 25.9g (100 minitubérculos, 26.10%), de 26.0 a 35.9g (110, 28.72%) y de 36.0 a 50.0 g (90, 23.49%) con diferencias significativas a los que tuvieron más de 50.0g (48, 12.53%). Las tres primeras categorías representaron el 78.31% del número total de minitubérculos producidos en ese tratamiento.

Con 0.15 x 0.15m el 77.3% de los minitubérculos se clasificaron en las categorías de masa fresca de 16.0 a 50.0 g, mientras que con 0.20 x 0.20m se obtuvieron sólo 31 minitubérculos por m<sup>2</sup> y todos se clasificaron en las categorías de mayor masa fresca (superior a 26.0g), sin diferencias significativas entre ellas.

Estos resultados concuerdan con referencias previas de obtención de minitubérculos a partir de plantas producidas *in vitro* en condiciones de casa de cultivo en papa (*Solanum tuberosum* L.) (Fazeli *et al.*, 2007; Montoya *et al.*, 2008).

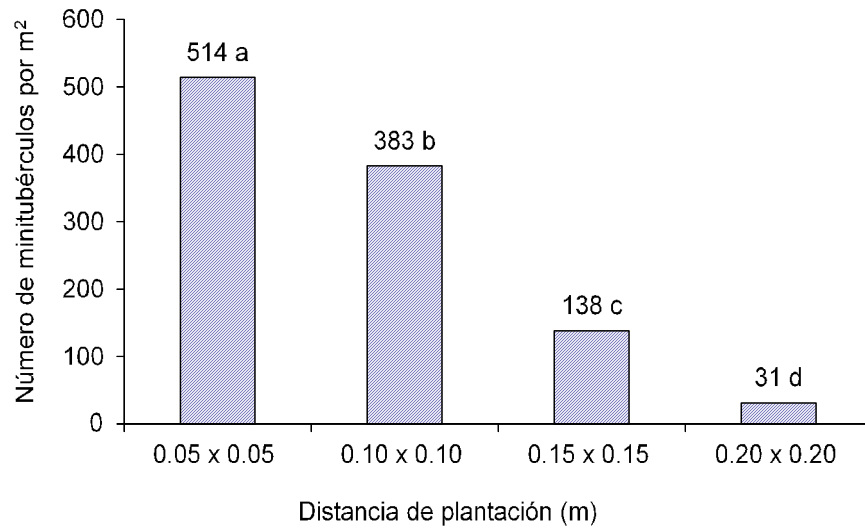


Figura 1. Efecto de la distancia de plantación sobre el número de minitubérculos de ñame cv. 'Blanco de Guinea' obtenidos a partir de plantas *in vitro* en casa de cultivo. Medias con letras no comunes sobre barras indican diferencias según la prueba de *Kruskal Wallis* para  $p < 0.05$  ( $n=4$ ).

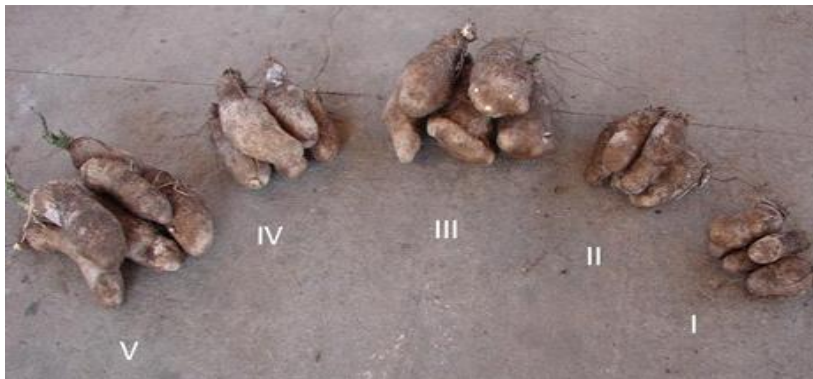


Figura 2. Minitubérculos de ñame cv. 'Blanco de Guinea' clasificados por categoría según la masa fresca: I. 5.0 a 15.9g; II. 16.0 a 25.9g, III. 26.0 a 35.9g; IV. 36.0 a 50.0g y V. más de 50.0g.

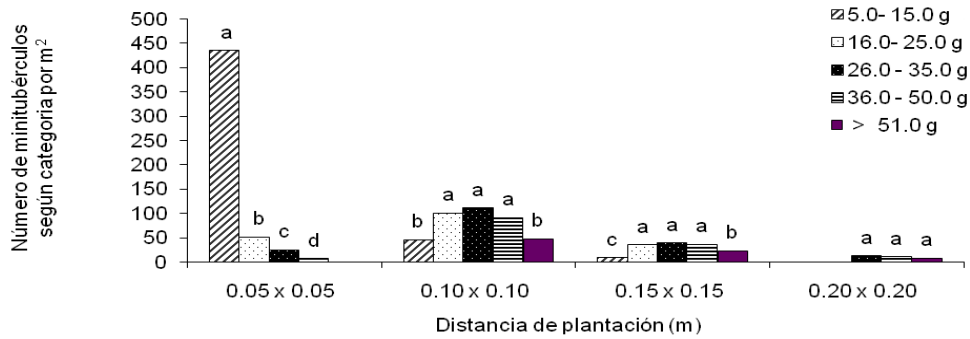


Figura 3. Efecto de la distancia de plantación sobre el número de minitubérculos de ñame cv. 'Blanco de Guinea' por m² según las categorías de masa fresca. Letras no comunes sobre las barras de una misma distancia de plantación indican diferencias según prueba de *Kruskal Wallis* para  $p < 0.05$  ( $n=4$ ).

En una investigación en el cultivo de la papa (*S. tuberosum* L.) Jiménez-Terry *et al.* (2010) observaron que a las mayores distancias de plantación de las plantas producidas *in vitro* se observaron valores significativamente mayores en número y masa fresca de los minitubérculos por planta y coincidentemente con los resultados de esta investigación, ellos encontraron que la variante de 0.10x0.10m era la mejor.

En *D. rotundata* Olivier *et al.* (2012) obtuvieron minitubérculos con menos de 15.0 g a las 14 semanas en aclimatización aunque para ello necesitaron añadir sacarosa y ácido jasmónico, lo cual encarece el proceso y no garantiza obtener minitubérculos con una masa fresca superior a 26 g. En la experiencia de dichos autores no se detalla en qué forma se ubicaron las plantas para producir minitubérculos aunque al parecer fueron plantadas en contenedores plásticos.

Este tipo de estudios es importante ya que demuestra el potencial que tiene la producción de minitubérculos a partir de plantas *in vitro* en casa de cultivo como semilla de alta calidad. Los resultados demostraron que esta puede ser una alternativa viable en el programa de producción de semilla para plantar en campo en una pequeña área, lo que puede hacerse antes de la época de siembra y luego llevar los minitubérculos al campo. Ello está en consonancia con las apreciaciones de Agramonte (2000) quien señaló que el objetivo principal de estas plantaciones en casa de cultivo era lograr elevados volúmenes de semilla con calidad en un espacio relativamente reducido.

Teniendo en cuenta el efecto positivo que ha demostrado el cultivo de tejidos para rejuvenecer material vegetal de plantación en otras especies (Medero, 2006), que no existe experiencia previa en la producción de minitubérculos de *D. rotundata* Poir y que la supervivencia de las plantas producidas *in vitro* en condiciones de campo es muy baja (Ng, 1992), sería importante desarrollar investigaciones dirigidas a evaluar la respuesta de los minitubérculos en la producción de semilla en campo.

## CONCLUSIONES

La distancia de plantación influyó en la producción de minitubérculos de ñame cv.

'Blanco de Guinea'. A la distancia de plantación de 0.10 x 0.10m se obtuvo el mayor número de minitubérculos (248) con una masa fresca superior a 26.0g.

## REFERENCIAS

Agramonte, D (2000) Métodos biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (*Solanum tuberosum* L.) var. 'Desirée'. Tesis de Doctorado. IBP. UCLV. Santa Clara, Cuba

Balogun MO (2009) Microtubers in yam germplasm conservation and propagation: the status, the prospects and the constraints. *Biotech Mol Biol Reviews* 4(1): 1-10

Cabrera M, Kosky R, Espinosa E, Espinosa A (2012) Effect of semi-automated culture systems on yam (*Dioscorea alata* L.) microtuber formation. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 16(2): 45-47

Cabrera M, R Gómez, E Espinosa, J López, V Medero, M Basail, A Santos (2011) Yam (*Dioscorea alata* L.) microtuber formation in Temporary Immersion System as planting material. *Biotecnología Aplicada* 28(4): 268-271

Cabrera, J, Gómez R, Rodríguez S, López J, Rayas A, Basail M, Santos A, Medero V, Rodríguez G (2008) Multiplicación *in vitro* de segmentos nodales del clon ñame 'Blanco de Guinea' (*Dioscorea cayenensis* - *D. rotundata*) en sistemas de cultivo semiautomatizado. *Revista Colombiana de Biotecnología* 2:97-103

Fazeli R, M (2007) Mini-tuber production as affected by planting bed composition and node position in tissue cultured plantlet in two potato cultivars. *Int J Agric & Biol* 9(3): 416-418

INIVIT (2012) Instructivo técnico para la producción de semillas de viandas. En: Martínez E (Ed) Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT)-Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). La Habana.

IPGRI/IITA (1997) Descriptores para el ñame (*Dioscorea* spp.). Instituto Internacional del Agricultura Tropical, Ibadán, Nigeria/ Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Roma

Jiménez-Terry F, Agramonte A, Pérez M, Rodríguez M, de Fera M, Alvarado-Capó Y (2010) Producción de minitubérculos de papa var 'Desirée' en casa de cultivo con sustrato zeolita a partir de plantas cultivadas *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 10(4): 219-228

Medero V (2006) Embriogénesis Somática en Yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis en opción al título

de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila

MINAG (2008) Instructivo Técnico del Cultivo del Ñame. Castellanos, P. (Ed.). SEDGRI/AGRINFOR, Ministerio de la Agricultura. Ciudad de La Habana

Montoya N, D Castro, J Díaz, D Ríos (2008) Tuberización *in vitro* de papa (*Solanum tuberosum* L.), variedad Diacol Capiro, en biorreactores de inmersión temporal y evaluación de su comportamiento en campo. Ciencia 16(3): 288-295

NG SYC (1992) Micropropagation of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir.) Biotechnology in Agriculture and Forestry 19:136-159

Olivier KA, Kona KN, Anike FN, Agbo GN, Dodo HW (2012) *In vitro* induction of minitubers in yam (*Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex), Plant Cell Tiss Organ Cult 109: 179-189

Onovo OP, Kevers C, Dommès J (2010) Effect of storage conditions on sprouting of microtubers of yam (*Dioscorea cayenensis*-*D. rotundata* complex). CR Biol 33:28-34

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

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

Tamiru M, Becker HC, Maass BL (2008) Diversity, distribution and management of yam landraces (*Dioscorea* spp.) in Southern Ethiopia. Genet Res Crop Evol. 55: 115-131

Yan H, Yang L, Li Y (2011) Axillary shoot proliferation and tuberization of *Dioscorea fordii* Prainet Burk. Plant Cell Tiss Organ Cult 104:193-198

Recibido: 10-06-2014

Aceptado: 12-02-14