



UNIVERSIDAD DE CIENFUEGOS
“Carlos Rafael Rodríguez”

“Escalado de la propagación *in vitro* del ñame ‘Blanco de Guinea’ en la Biofábrica de Cienfuegos”

Tesis presentada en opción al título de Ingeniero Agrónomo

Autora: Laritza Noblet Carbonell

Tutores: Dr. C. Víctor R. Medero Vega

MSc. Milagros Basail Pérez

Consultante: MSc. Marilyn Fontes Leandro

Cienfuegos, 2014

PENSAMIENTO

Decididamente la Revolución habrá de avanzar al máximo en el campo de la investigación. Esa es otra idea fundamental que no debemos olvidar ni un solo instante.

Fidel Castro Ruz.

AGRADECIMIENTOS

Son una parte amorosa y necesaria quienes han contribuido a hacer realidad este sueño, son merecedores del mérito que significa este fruto y son principalmente los que hoy y siempre tendrán mi eterna gratitud.

♠ *A mis tutores Dr. Víctor Medero Vega, MSc. Milagros Basail Pérez y Marifyn Fontes Leandro porque con dedicación esmerada y talento han impulsado la idea hasta convertirla en obra.*

♠ *A mis familiares, hijos, esposo y amigos que dieron aliento a mis pasos.*

♠ *A las técnicas Yipsis Rodríguez, Mildrey Chaviano Yaima Oliva y Mileidis Cruz por haber encontrado en ellas siempre su apoyo en la realización de los experimentos.*

♠ *A todos mis compañeros del grupo por el empeño en este trabajo y la preocupación constante, especialmente a Kenia Martínez, mi amiga, a Yanay Sarria, Annia, Laisa, Yaima, Andrés, Geysel, Guille y Anay por la ayuda en los momentos precisos.*

♠ *A los compañeros por su apoyo en las búsquedas bibliográficas: Raúl, Ayme y Paul.*

♠ *A la MSc. Carmen C. Pons Pérez por su apoyo en la realización de los análisis estadísticos.*

♠ *A mi suegra por su gran apoyo brindado durante todos estos años.*

♠ *A todas las personas que de una forma u otra han colaborado con la realización de este trabajo.*

♠ *A los trabajadores de la Biofábrica y de la UEB Semillas porque han cooperado con voluntad, talento y paciencia en el resultado que hoy puedo entregar.*

A Todos

Muchas Gracias

DEDICATORIA

Si ustedes a mi sueño han dedicado lo mejor de sus vidas, entonces, todo lo bueno me hará recordarlos.

A la memoria de padre y mi hermano.

A mis amistades porque alimentaron la esperanza con la miel de la razón.

A mis hijos, y esposo porque no hay obra perfecta sin amor.

RESUMEN

La presente investigación se realizó en la Biofábrica de Cienfuegos y el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en la provincia de Villa Clara, durante el período comprendido entre septiembre de 2013 y mayo de 2014. El objetivo principal consistió en evaluar, en condiciones de Biofábrica, la propagación del clon de ñame 'Blanco de Guinea' para la producción de semilla de alta calidad genética y fitosanitaria. Se evaluó el efecto del Vitrofurax (G1) como esterilizante químico del medio de cultivo, en comparación con el empleo de las autoclaves. Se estudiaron dos tipos de frascos de cultivo (pomos de vidrio de 250 mL de volumen y magentas de 500 mL) para la propagación *in vitro*, así como se evaluó el porcentaje de supervivencia en fase de aclimatización. Como resultado se logró la implementación de la micropropagación del ñame, donde se realizó el adiestramiento a los técnicos en el manejo de los explantes para alcanzar coeficientes de multiplicación aceptables y pérdidas por contaminaciones dentro del rango permisible para estas entidades. El uso de la esterilización química con G1 del medio de cultivo fue factible. Se determinó que los pomos de vidrio de 250 mL constituyen el mejor frasco de cultivo para la propagación *in vitro* del ñame. En fase de aclimatización se lograron porcentajes de supervivencia superiores al 85%. Además, se recomienda aplicar los resultados alcanzados para obtener un material de plantación de alta calidad que permita la producción de semilla categorizada de este cultivo en la provincia de Cienfuegos.

SCALING UP OF IN VITRO YAM PROPAGATION, cv. 'BLANCO GUINEA' AT CIENFUEGOS BIO-FACTORY

ABSTRACT

The present research was carried out from September 2013 to May 2014 at Cienfuegos bio-factory and at the Research Institute of Tropical Roots and Tuber Crops, Bananas and Plantains (INIVIT) located at Villa Clara province. The main objective was based on the evaluation of yam (cv. 'Blanco Guinea') propagation for seed production of high genetic and phytosanitary quality. The Vitrofurax (G1) effect as chemical sterilizer in culture media in comparison to the use of autoclaves was evaluated. Two culture flasks (250 mL glass flasks and 500 mL containers) for *in vitro* propagation were studied. The surviving percentage during the acclimatization stage was also evaluated. Yam micro-propagation was implemented. Technicians were well-trained on explant management to obtain acceptable multiplication coefficients and allowable loss ranges for these entities due to contamination. The use of chemical sterilization with G1 was feasible. 250 mL glass containers constituted the best culture flask for *in vitro* yam propagation. At the acclimatization stage, surviving percentages higher than 85% were obtained. Besides, results obtained are recommended to obtain high quality planting material for a categorized seed production in this crop at Cienfuegos province.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. Introducción	1
2. Revisión Bibliográfica	4
2.1. Sistemática	4
2.1.1. Origen	4
2.1.2. Taxonomía y Sinónimos	4
2.1.3. Morfología y Fisiología	4
2.2.1. Micropropagación.....	5
2.2.1. Organogénesis. Aspectos generales.....	6
2.3. Propagación masiva en Biofábrica	9
2.4. Escalado de la producción <i>in vitro</i> en Biofábrica	9
2.5. Aclimatización.....	10
2.5.1. Fisiología del cultivo <i>in vitro</i> que repercute directamente en la aclimatización.....	10
2.5.2. Técnicas de aclimatización	12
2.5.3. Instalaciones para la aclimatización	13
2.5.4. Manejo de las plantas en la aclimatización	14
2.6. Cultivo <i>in vitro</i> del ñame.....	14
3. Materiales y Métodos	18
3.1. Material Vegetativo	18
3.2. Procedimientos generales	19
3.3. Evaluación de la micropropagación del genotipo de ñame en la Biofábrica ...	20
3.3.2. Evaluación del efecto del tipo de frasco sobre la propagación <i>in vitro</i> de ñame, durante tres subcultivos	21
3.3.3. Aclimatización de plantas producidas <i>in vitro</i>	22
4. Resultados y Discusión	23
4.3.1. Evaluación del efecto del tipo de esterilización sobre la propagación <i>in vitro</i> del ñame.....	23

4.3.2. Evaluación del efecto del tipo de frasco sobre la propagación <i>in vitro</i> de ñame, durante tres subcultivos	25
4.3.3. Aclimatización de las plantas producidas <i>in vitro</i> de ñame.	30
5. Conclusiones	33
6. Recomendaciones	34
7. Bibliografía	35

1. INTRODUCCIÓN

El tubérculo de ñame (*Dioscorea* spp.) constituye una de las principales fuentes alimenticias de muchas poblaciones en las regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. Este cultivo 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 rotundata*, Poir) es una de las más cultivadas en el mundo. La producción mundial en los últimos cinco años se estima en más de 253,5 millones de toneladas y se siembran más de 5,5 millones de hectáreas anualmente (González, 2012).

Desde que esta especie se comenzó a cultivar por el hombre se ha propagado por tubérculos enteros y secciones de tubérculos. 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 se ha convertido en un excelente cultivo de ecosistemas montañosos, a partir del cual los campesinos de dichas regiones satisfacen parte de su demanda energética 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 sembrado ñame, sino también en el occidente del país debido a la constante emigración de una región a otra. La producción en el país se estima en alrededor de 366 182 toneladas (FAOSTAT, 2012).

Por otra parte, su producción ha ayudado a la diversidad y estabilidad alimentaria, tradicionalmente este cultivo ha sido 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.

La necesidad de producir material de plantación de alta calidad y rejuvenecidos fisiológicamente, disponibles para los productores de ñame ha requerido de la búsqueda de alternativas que garanticen el incremento de la eficiencia en los métodos de propagación y por lo tanto la aplicación de las técnicas biotecnológicas. En el Instituto de Investigaciones de Vianda Tropicales (INIVIT), se han desarrollado protocolos de propagación *in vitro* de ñame por organogénesis, a partir de segmentos nodales, en diferentes clones (Medero *et al.*, 1999; Cabrera *et al.*, 2003 y Cabrera, 2009). Actualmente, toda la semilla básica que se produce en la institución de este cultivo permite disponer en un tiempo relativamente corto de una gran cantidad de material, libre de plaga y enfermedades, fisiológicamente rejuvenecido y de alto potencial productivo por el uso de las técnicas biotecnológicas; sin embargo no se ha logrado la implementación a escala de Biofábrica de estos protocolos. Por lo que se hace necesario lograr la transferencia a la Biofábrica de Cienfuegos de la metodología de micropropagación del ñame y su adopción con porcentajes aceptables de supervivencia de las plantas producidas *in vitro* a nivel de fase de aclimatización, con la siguiente **hipótesis de trabajo**:

“Si se logra estandarizar la metodología de micropropagación de ñame en la Biofábrica de Cienfuegos entonces, se dispondrá de un material de plantación de alta calidad genética y fitosanitaria para la producción de semillas de este cultivo en la provincia”.

Para dar cumplimiento a la hipótesis formulada, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

- Evaluar, en condiciones de Biofábrica, la propagación del clon de ñame ‘Blanco de Guinea’ para la producción de semilla de alta calidad genética y fitosanitaria.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto de la esterilización química en la multiplicación del ñame.
- Estudiar la influencia de diferentes frascos de cultivo para la propagación *in vitro*.
- Evaluar la respuesta de las plantas producidas *in vitro* en fase de aclimatización.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Sistemática

2.1.1. Origen

El ñame pertenece al género *Dioscorea* el cual es muy amplio, lo encontramos en las regiones lluviosas del trópico, otros en las regiones subtropicales. La especie *Dioscorea alata* es originaria de Asia, *Dioscorea cayenensis* y *Dioscorea rotundata* en África y el *Dioscorea trifida* es originaria de América Tropical.

2.1.2. Taxonomía y Sinónimos

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Liliopsida*

Orden: *Dioscoreales*

Familia: *Dioscoreaceae*

Género: *Dioscorea*

Especie: *Dioscorea rotundata* (L)

La familia *Dioscoreaceae* la cual contiene 6 generos diferentes: *Stenomeris*, *Avetra*, *Trichopus*, *Rejania*, *Tamus* y *Dioscorea*, siendo este último el más importante desde el punto de vista de la alimentación humana, el género *Dioscorea* al que pertenecen más 600 especies, de ellas alrededor de ocho especies son la de mayor importancia económica: *D. alata*., *D. cayenensis* Lam, *D. dumetorum* Pax, *D. esculenta* Murk, *D. rotundata* (L) Poir, *D. trifida* L y *D. floribunda* Mart.

2.1.3. Morfología y Fisiología

La planta del ñame es tropical, se cultiva en actitudes desde 0 m.s.n.m. hasta 300m, con temperaturas entre 20-25 °C, precipitaciones superiores a 200 mm anuales, en suelos de textura franca arenosa, con buen drenaje y PH 5,5-6,5 y con buena fertilidad.

Son plantas trepadoras, herbáceas y de hábito perenne que crecen entre 2 a 12m. Las hojas, anchas y de forma acorazonada, se disponen en espiral. Las flores, de seis pétalos son inconspicuas y de color verde amarillento; son principalmente dioicas (flores masculinas y femeninas en diferentes plantas), aunque algunas especies son monoicas (flores masculinas y femeninas en la misma planta). En la mayoría de especies el fruto es una cápsula, en otras cuantas una baya blanda.

Se plantea que el ñame es una planta de tallos volubles, delgados que enrollan hacia la izquierda, provisto de dos a ocho a la membranosa, generalmente con mayor número y desarrollo en la parte inferior del tallo. La planta requiere abundante luz para obtener mayor producción y es caracterizada por tubérculo subterráneo o aéreo. El tallo subterráneo es un órgano irregular y corto del que emergen los tallos aéreos, raíces y estolones, esto último en forma de círculos sucesivos. El estolón que mide hasta 70cm de largo se ensancha formando el tubérculo.

Los tubérculos varían mucho en forma y tamaño aun en la misma planta, los hay en forma esférica, fusiforme, claviforme y a menudo con ramificaciones muy cortas. La superficie es rugosa, a veces con raicillas. La pulpa es uniforme, compacta y varia de color blanco, amarillo hasta morado, con un sabor y apariencia característica, después de cocido. El peso esta entre 300 y 400g cada uno.

Las plantas son unisexuales. Las inflorescencia estimada son racimos simples o muy ramificados; la inflorescencias pistiladas de dos racimos nacen de la misma axila con flores de 12 a 24mm de largo.

2.2.1. Micropropagación

Originalmente la micropropagación se definió como “cualquier” procedimiento aséptico que comprenda la manipulación en las plantas de órganos, tejidos o células que produzcan poblaciones de plántulas y que permitan el desvío tanto del proceso sexual normal como de la propagación vegetativa no aséptica que se practica convencionalmente. La micropropagación clonal implica que cada una de las plántulas que se produce pueda crecer y ser fenotípicamente idéntica a la planta original de la que se deriva (Villalobos y Thorpe, 1991).

2.2.1. Organogénesis. Aspectos generales

La organogénesis es un evento morfogenético que se caracteriza por su desarrollo unipolar, en otras palabras, es la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsecuente desarrollo de éste en un brote vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno. Estos brotes vegetativos son posteriormente puestos a enraizar en otra etapa, vía formación de primordios de raíces y el enraizamiento final. Los brotes pueden formarse directamente del explante (organogénesis directa) o indirectamente a partir de callos. En la vía organogénica para lograr la formación de una planta completa, ya sea por la vía directa o indirectamente, se requiere de una secuencia de medios de cultivo, ya que aquellos medios favorecen el desarrollo de los brotes, la formación de raíces y viceversa (Jiménez, 1998).

La organogénesis ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: la formación de yemas axilares y la formación de yemas adventicias.

1. Formación de yemas axilares.

Se basa en la formación de brotes a partir de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas o primordios de hojas, los cuales son divididos y subcultivados respectivamente (Hu y Wang, 1983). Este método ha sido el más utilizado para la propagación comercial debido a la facilidad con que se ha establecido en la mayoría de las especies y a la estabilidad genética de las plantas regeneradas, siendo el sistema de regeneración en el cual se reportan los menores índices de variación genética.

2. Formación de yemas adventicias.

Esta técnica se basa en la formación de Novo de yemas a partir de meristemas preexistentes o tejidos no meristemáticos, los cuales se originan de una o de un pequeño grupo de células, cuando se cultivan los explantes en medios de cultivos con concentraciones elevadas de citoquininas (Vuylsteke y de Langhe, 1985).

De esta forma es posible producir un mayor número de plantas por unidad de tiempo en comparación con el método de yemas axilares y a la vez presenta mayores

posibilidades de mecanización-automatización, existiendo ya varios ejemplos de utilización de biorreactores para su producción (Akita *et al.*, 1994).

2.2.1.1. Propagación *in vitro* vía organogénesis

Por sus ventajas constituye la tecnología más utilizada para la clonación de especies de interés económico. Es una tecnología relativamente simple, bien conocida, que se realiza a partir de la multiplicación de yemas, ápices o meristemas con más de dos décadas de experiencia, por lo que se ha designado con el término de “micropropagación convencional” (Orellana, 1998; Pérez *et al.*, 1998).

A escala comercial se han encontrado algunas desventajas que elevan los costos finales de las plantas, dentro de los cuales tenemos el gran número de operaciones manuales y su alto costo por mano de obra, el cual está comprendido entre el 80 y 90% del costo final de las plantas (Ziv, 1989) y entre un 50 y 80%, según Pérez *et al.* (2000). Otros aspectos lo constituyen el elevado gasto por energía eléctrica, el uso de agar como agente gelificante en el medio de cultivo y los frascos de capacidad limitada.

Además, esta técnica presenta restricciones desde el punto de vista biológico, ya que en la mayoría de las especies micropropagadas los coeficientes de multiplicación son bajos, lo cual también incrementa los costos de producción y disminuye la eficiencia en el proceso; siempre que sea considerada la eficiencia como el número de plantas generadas por unidad de tiempo (Villalobos y Thorpe, 1991; citados por Jiménez y De Fera, 1998). Razón por la cual Pérez *et al.* (1998), señalan que la eficiencia del proceso está determinada por la fase de multiplicación y su parámetro fundamental es el coeficiente de multiplicación; indicando que por cada unidad de aumento en el mismo, disminuyen los costos en un 10%.

No obstante, a pesar de las limitaciones, la propagación vía organogénesis posee un gran número de ventajas; motivo por el cual un notable número de investigadores consideran que es posible su aplicación a escala comercial logrando hacerla más eficiente mediante la automatización, cambios tecnológicos, medidas organizativas y de control (Vasil, 1994; Pérez *et al.*, 1998). El aumento de la eficiencia en la micropropagación convencional está muy relacionada con el perfeccionamiento de las técnicas *in vitro* para incrementar los coeficientes de multiplicación y el volumen

de material por área de cuarto de cultivo; y si es posible la automatización o semiautomatización de algunas etapas de la micropropagación, con énfasis en aquellas que mayor consumo de mano de obra implican (Orellana, 1998; Pérez *et al.*, 1998).

2.2.1.2. Etapas o fases de desarrollo en la micropropagación *in vitro*

Según la experiencia, en la propagación comercial pueden identificarse bien definidas con sus objetivos específicos cinco etapas:

- **Fase Preparativa (0):** Es importante, o casi indispensable, en el desarrollo de un esquema de micropropagación real y repetible, es una etapa preparativa donde se incluye la selección de la planta donadora y una serie de pretratamientos en condiciones higiénicas controladas, cuyo objetivo es mejorar la eficiencia en la implantación y desarrollo posterior de los cultivos.

Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético.

- **Fase de establecimiento o iniciación de los cultivos (I):** El objetivo de esta etapa es lograr el establecimiento de cultivos axénicos y fisiológicamente vigorosos con los cuales iniciar el proceso de multiplicación.

- **Fase de multiplicación (II):** Esta es la fase más importante y determinante en todo programa de propagación *in vitro*, es en ella que se realiza la verdadera multiplicación o micropropagación de una especie o variedad definiéndose no sólo el número de plantas o propágulos a obtener, sino su calidad genética por ser esta fase en la que se producen las variantes somaclonales.

El objetivo de esta fase es la producción del mayor número posible de propágulos (plantas, microtubérculos, microbulbillos) a partir de explantes (meristemos apicales o axilares, yemas axilares o adventicias), ya establecidos *in vitro*.

- **Fase de enraizamiento (III):** Es la fase más voluminosa de todo el proceso, pues en ella cada brote, esqueje o yema de forma individual que se ha formado durante la fase de multiplicación, debe ser cultivada y manipulada *in vitro* para que, además de crecer y desarrollar un pseudotallo o tallo con las primeras hojas, forme y desarrolle varias raíces que le permitan comenzar la absorción de

nutrientes al trasplantarse sobre un sustrato enriquecido y convertirse en una planta producida *in vitro* aclimatizada lista para llevarse a campo.

- **Fase de aclimatización (IV):** Es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de esta, dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso.

2.3. Propagación masiva en Biofábrica

En Cuba la propagación masiva de plantas comenzó a finales de la década del 70, con laboratorios que producían de 100 a 200 000 las plantas producidas *in vitro* anuales de papa y paralelamente, los grandes centros científicos del país y las universidades comenzaron a desarrollar tecnologías, no solo de cultivo de tejidos sino también de diagnóstico y saneamiento a los principales patógenos, así como para la identificación y caracterización de la variabilidad somaclonal. En 1987 se construye la primera Biofábrica del país (denominada como de Primera Generación) y entre 1987 y 1993, el número se elevó a 15 (Pérez *et al.*, 1998).

2.4. Escalado de la producción *in vitro* en Biofábrica

El desarrollo de la ciencia y la técnica no se concibe sin su implementación práctica en un sistema productivo y económicamente eficiente, esto último es vital para que los adelantos creados puedan dar solución a los problemas para los cuales fueron previstos; por otra parte los resultados de la ciencia aplicada deben responder a las actuales exigencias del mercado, donde hay un predominio de la competencia, por lo que es necesario ofertar productos de alta calidad y precios asequibles a los clientes. Sin embargo es reconocido que para ello, debe tenerse en cuenta estos aspectos desde la propia concepción y diseño de las investigaciones, hasta su instrumentación práctica a escala industrial o masiva y precisamente este enfoque sistémico se enmarca dentro del llamado Escalado de la Producción (Suárez y Alvarado, 1997).

Muchos autores reconocen que los procesos que se desarrollan a nivel de laboratorio no alcanzan los mismos resultados cuando aumenta el volumen, lo cual trae aparejado el fracaso y/o una demora excesiva en su aplicación a nivel industrial, con el consiguiente alargamiento del ciclo de vida de los productos. De lo anterior, deben esclarecerse dos conceptos muy importantes: el Escalado de la Producción y el Ciclo de Vida del Producto.

Viñas (1994) expresó al respecto, que el escalado se define, como “el proceso necesario para alcanzar la producción industrial a partir de un logro científico a nivel de laboratorio”, mientras que el ciclo de vida de un producto no es más que “el tiempo que transcurre desde la concepción hasta su comercialización”; Morita (1992) confirma que éstos conceptos son de suma importancia para poder alcanzar la competitividad necesaria si tenemos en cuenta que los precios oportunos en el mercado van variando en el tiempo, lo que implica la necesidad de minimizar el ciclo de vida de los productos. Un ejemplo clásico corresponde a la comercialización de plantas ornamentales, donde se reconoce que las variedades de mayor impacto pueden mantenerse en el mercado entre 6 a 12 meses por tanto el desarrollo de nuevas tecnologías para la propagación de las mismas deben tener en cuenta ésta particularidad.

2.5. Aclimatización

2.5.1. Fisiología del cultivo in vitro que repercute directamente en la aclimatización

Respuesta de los tejidos

1. Alteración del contenido de ceras epicuticulares
2. Funcionamiento sistemático anormal
3. Disminución del contenido de clorofila
4. Menor peso seco final
5. Disminución del área foliar
6. Disminución del número estomático
7. Menor desarrollo anatómico

Respuesta de la planta

1. Crecimiento suculento
2. Desórdenes fisiológicos y morfológicos
3. Menor tasa de crecimiento
4. Presencia de contaminación
5. Mayor frecuencia de mutaciones

Como consecuencia del ambiente *in vitro*, todos los factores descritos anteriormente contribuyen al desarrollo de la planta con un fenotipo incapaz de sobrevivir al trasplante a invernadero o campo (Preece y Sutter, 1991) debido al estrés hídrico provocado por la ausencia de regulación estomática (Ziv *et al.*, 1987) y menor cantidad de ceras epicuticulares (Conner y Conner, 1984; Sutter, 1988), tallos más delgados, reducción de tejidos mecánicos de soporte, incremento del contenido de agua en las células y crecimiento heterótrofo o mixótrofo. Estos aspectos fisiológicos de la planta *in vitro* indican que es necesaria una etapa especial que permita el retorno gradual de estas plantas a sus características normales.

La aclimatización es un proceso necesario y gradual, a través del cual se reducen al máximo las pérdidas de las plantas *in vitro* después de su trasplante a condiciones *in vitro* donde las plantas deben adaptarse a las nuevas condiciones, de forma progresiva respecto a su estructura y fisiología y deja de ser un organismo heterótrofo o mixótrofo (nula o baja capacidad fotosintética). Durante la fase de adaptación estas plantas están forzadas a ser completamente autótrofas y sintetizar los compuestos orgánicos necesarios a partir de minerales, agua, CO₂ y luz. Este cambio en las plantas, así como, la morfología de las mismas, determina la susceptibilidad durante las etapas iniciales del proceso de aclimatización. Los objetivos primarios de esta fase son lograr la supervivencia de las plantas al momento del trasplante y al inicio del crecimiento de las mismas (Jiménez y Caballero 1990; Morán, 2008).

La fase de aclimatización es la etapa final del proceso de micropropagación de ahí que sea trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de esta dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso y por tanto su meta es lograr plantas listas para su trasplante definitivo a campos comerciales de producción o bancos de semillas para ser multiplicadas.

Las plantas producidas *in vitro* presentan la cutícula poco desarrollada, debido a la alta humedad relativa presente en el tubo de ensayo (90-100%), lo que provoca una excesiva pérdida de agua post- trasplante, las hojas son delgadas, blandas y fotosintéticamente poco activas, presentando pocas y pequeñas células de parénquima empalizada, con baja eficiencia en el uso de la luz y con grandes

espacios en el mesófilo, los estomas no operan adecuadamente, siendo la causa de mayor pérdida de agua durante las primeras horas de aclimatización, a su vez, existe una pobre conexión vascular lo que reduce la conducción de agua, además las raíces son poco funcionales, presentando epidermis no suberificadas y pocos pelos radicales, los que generalmente mueren post-trasplante y debe ser regenerados (Nava, 2008; Bazaldú *et al.*, 2008).

Lo fundamental de esta etapa es que las plantas forman un buen sistema radical, debido a que su nutrición dependerá durante mucho tiempo y en gran parte de la efectividad de sus raíces. Este período es crucial en la vida de las plantas, para evitar que se produzca situación de estrés a plantas que inician su desarrollo, cuya manifestación podría no ser observable, hasta que el individuo no haya alcanzado la fase adulta (Roca, 1991).

2.5.2. Técnicas de aclimatización

Diversas técnicas han sido aplicadas a las plantas *in vitro* para lograr su aclimatización, todas ellas con el propósito de lograr su supervivencia y calidad fisiológica antes de la plantación a campo. A continuación se hará referencias a algunas de ellas (Santamaría *et al.*, 2000).

El proceso de aclimatización se puede comenzar mientras las plantas estén *in vitro* (Ziv, 1986) logrando incrementar el porcentaje de supervivencia hasta un 90% con nueve días destapadas antes del trasplante. Millar (1983) propuso destapar las plantas unos días antes en el propio lugar donde se adaptarán las plantas producidas *in vitro*, es decir, en el invernadero o en el propio campo. Contrario a lo que se supone, la contaminación del medio que contiene sacarosa no se convierte en un problema a menos que las vasijas se mantengan destapadas durante tiempo; el destapado se debe hacer por etapas y es muy útil en los lugares donde no hay control sobre la humedad.

Rodríguez (1990) plantea que las plantas *in vitro* en la fase de enraizamiento deben transcurrir la mitad del tiempo en la cámara de crecimiento y la otra mitad en el invernadero, donde los cultivos reciben la luz natural con mayor intensidad.

(Donan, 1991) recomienda colocar los recipientes de los cultivos a invernaderos por algunos días antes de sacar las plantas, esto con la finalidad de lograr pre-adaptarse

a los regímenes de luz y de temperatura que prevalecerá en el invernadero durante el trasplante. Con tal procedimiento se puede ocasionar un problema de acumulación de calor al tocar los recipientes tapados debido a un doble efecto de invernadero, este problema puede solucionarse quitando las tapas de los recipientes de los cultivos siempre y cuando se procure proporcionar a las plantas una alta humedad relativa para prevenir su desecación.

Para garantizar estas condiciones de aclimatización son necesarias instalaciones que regulen las condiciones ambientales naturales tratando de brindar fundamentalmente condiciones de humedad e iluminación que atenúen el cambio de las condiciones *in vitro* a las condiciones *in vivo*.

2.5.3. Instalaciones para la aclimatización

Los umbráculos son las instalaciones más sencillas y de más bajo costo. La estructura puede ser de diversos materiales, pero lo más frecuente es la tubería galvanizada con un tejido de alambre al que se sujeta la malla plástica de sombra que por lo general es de polipropileno, es una magnífica instalación para lugares donde el viento es muy fuerte, excepto para las plantas altamente exigentes a humedad ambiental. Entre los inconvenientes del umbráculo está su baja protección del viento y que la temperatura del suelo es inferior a la del suelo que se encuentra al aire libre, la cual puede afectar al cultivo que requiere buena temperatura de raíz (Jiménez y Caballero, 1990; Agramonte *et al.*, 1998; Jiménez, 2009).

El umbráculo es un lugar creado para proteger a las plantas de un proceso de luz principalmente. Sus desventajas radican que no permite controlar las inclemencias del tiempo como las bajas temperaturas, las lluvias, aunque puede influir a la fuerte acción del viento independientemente de su emisión principal (Quesada, 1994; Agramonte *et al.*, 1998).

Bajo el nombre de invernadero, se conoce toda aquella estructura cerrada con una cubierta plástica. De la calidad de la cubierta dependerá en principio un mejor o peor efecto invernadero y por lo tanto a un mejor o peor clima en la zona protegida, (Agramonte *et al.*, 1998).

Las bondades del invernadero la definen tres aspectos (Sanz de Galdeano, 1990).

- La capacidad para regular climatología en función del cultivo y del clima exterior.

- Su funcionalidad, es decir, su montaje y diseño que permite económicamente un óptimo estado técnico.
- Su viabilidad futura.

Jiménez (2009) define dos grupos de invernaderos: por un lado, aquellos que tratan de aprovechar al menor costo posible las ventajas climáticas de las zonas donde se ubica y por otra, las que utilizan sistema activo de manejo climático. El principal problema de los invernaderos en el trópico es que en el verano su temperatura interior llega a los 40°C a veces incluso sombreando, y la humedad relativa desciende a niveles muy peligrosos para todos los cultivos.

La solución que suele adaptarse es sombrear llegando a interceptar entre el 70 al 75% de la radiación incidente.

Los cambios rápidos notables a las técnicas biotecnológicas utilizadas a la producción vegetativa señalan la utilización de invernaderos con cobertura plástica en la fase de aclimatización. Los mismos constituyen sistemas sencillos de control climático con equipos de riegos y fertilización, etc., se ha difundido ambientalmente con el fin de aumentar la producción y calidad.

2.5.4. Manejo de las plantas en la aclimatización

Durante el cultivo *in vitro* las plantas tienen un escenario con alta humedad relativa (entre 85 y 100%), baja irradiación, carencia de CO₂, presencia de fuentes de carbono y reguladores del crecimiento en el medio de cultivo; las que inducen en la planta el desarrollo de una estructura y fisiología poco desarrollada. Las raíces son sensibles a sufrir daños, son poco funcionales, la fotosíntesis es baja y su aparato estomático es poco funcional (Bazaldú *et al.*, 2008).

Para alcanzar plantas aclimatizadas de una mejor calidad y uniformidad suficiente para ser llevadas a campo, el manejo de las plantas cultivadas *in vitro* debe ser paulatino y procurando hacer el menor perjuicio a las plantas. Esta etapa es donde ocurren la mayor cantidad de pérdidas (Sosa *et al.*, 2009).

2.6. Cultivo *in vitro* del ñame

El cultivo del ñame (*Dioscorea ssp*) se ha visto afectado en los últimos años por enfermedades y plagas, lo que ocasiona bajos rendimientos del cultivo y afectada la

producción del mismo, causada fuertemente por antracnosis (Perea, 2000). Por lo que la obtención de plantas sanas mediante el sistema *in vitro* ofrece la posibilidad de producir material libre de patógenos lo que mejora de modo sustancial la productividad del cultivo.

El inicio del cultivo de tejidos en *Dioscorea* spp. se remonta al 1958 del siglo XX y desde esa fecha hasta hoy se han realizado estudios en sus diferentes especies. Para lograr el éxito en la aplicación de estos sistemas de propagación clonal, es importante tener en cuenta el genotipo, su estado fisiológico, la selección del explante (parte de la planta), el suministro de nutrientes al medio de cultivo, el empleo de reguladores de crecimiento y las condiciones ambientales para el desarrollo de las plántulas (Perea, 2000, Chen *et al.*, 2007).

En Cuba, se han desarrollado estudios para la micropropagación a partir de segmentos nodales de *D. alata* (Medero *et al.*, 1997, 1999 y Cabrera *et al.*, 2003). Además, se ha evaluado la aclimatización de los clones de ñame (Aguilera *et al.*, 1999) y su conservación y regeneración *in vitro* (Borges *et al.*, 2004), así como la obtención de microtubérculos en medios de cultivo semisólidos (Medero *et al.*, 1997a) y en Sistema de Inmersión Temporal (Cabrera *et al.*, 2009).

Etapas o fases de desarrollo en la micropropagación *in vitro* del ñame, (Medero *et al.*, 1997b):

Etapas 0: Es la etapa inicial o preparatoria y consiste en:

- Selección genética y fenotípica del clon a propagar.
- Cultivar de forma aislada (casa de cristal) coronas de rizomas o bulbillos aéreos, desinfectados superficialmente con detergente y colocarlos sobre un saco de yute y hierba seca, delimitado con un marco de madera u otro material, se cubren con hierba seca y se le mantiene la humedad mediante riegos diarios. También pueden ser utilizadas bolsas de polietileno.

Etapas I: Es la etapa de iniciación y consiste en preparar el material seleccionado para la implantación. Cortar las guías vegetativas y tomar hasta los 10 primeros segmentos nodales, utilizar una tijera desinfectada (alcohol 70%) o cualquier otro tipo de material cortante que sirva para cumplir tal objetivo.

a) Desinfección del material.

Las guías vegetativas seleccionadas son llevadas al área limpia del laboratorio, donde se dividen en secciones de aproximadamente 3 cm de longitud y previendo que la yema axilar quede ubicada en el centro de cada una de estas. Posteriormente los segmentos nodales se lavaran con detergente comercial ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$), enjuagados con abundante agua hasta eliminar todo el desinfectante.

Bajo condiciones de asepsia (flujo laminar) se realizan los siguientes pasos:

- ✓ Sumergir el material en una solución de hipoclorito de sodio (NAOCL) 2.5% (v/v), por 10 minutos. Enjuagar con agua desionizada - estéril (5 veces). (Medero *et al.*, 1999).

Se pueden utilizar las puntas de meristemos y segmentos nodales, pero los mejores resultados se obtienen con los últimos.

Con el auxilio de pinzas, bisturí y sobre una placa de petri o un recipiente apropiado, se coloca el material desinfectado y se reduce el tamaño hasta 1.0 cm de longitud aproximadamente. La microestaca, se introduce con una pinza en un tubo de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962) que contiene, KIN ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), ANA ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) y $30,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarosa (Perea, 2001). Esta fase de cultivo se desarrollará durante un período de 30 días.

En la siguiente etapa:

Etapa II: Es la etapa de crecimiento o multiplicación.

Esta es la fase más importante, por lo que es necesario hacer un manejo adecuado del material, los explantes que han alcanzado un tamaño óptimo (al menos 2 segmentos nodales) y estén libres de contaminación (hongos y bacterias), se empleará el medio de cultivo basal MS con $30,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarosa y el subcultivo se realizará cada 35 días, al seccionar la planta *in vitro* en segmentos nodales con una yema axilar según la metodología propuesta por Medero *et al.* (1999). En ambas fases de cultivo se colocará un segmento nodal con una yema axilar por tubo de ensayo (diámetro 25 mm y longitud 150 mm) que contenía 10,0 mL de medio de cultivo en estado semisólido con $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de Agar-E (BIOCEN).

Las condiciones de cultivo que se emplearán para el establecimiento y multiplicación de los segmentos nodales son las siguientes: cámara de cultivo a $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ e iluminación artificial mediante lámparas blancas fluorescentes (Sylvania, Daylight

F40T12/D 40 W) que proporcionaron una intensidad de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. El fotoperíodo de 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad.

Etapa III: Corresponde al enraizamiento o etapa de pre-trasplante; facilita la obtención de plántulas autotróficas que pueden sobrevivir en las condiciones del trasplante al suelo.

Para la inducción del sistema radicular, se dividen las plántulas en microestacas de 2 a 3 segmentos nodales, colocándose de 4 a 6 por frascos que contengan un medio con el 50% de las sales MS y suplementado con 15 g.L^{-1} de sacarosa, 0.1 mg.L^{-1} de AIB, sin vitaminas y gelificado con 7 g.L^{-1} de agar-agar o en estado líquido, según proceda.

Etapa IV: Transferencia a la etapa de medio ambiente.

Extraer con pinzas las plantas producidas *in vitro* y lavar con agua corriente hasta la eliminación total de los residuos de agar y medio de cultivo. Plantar sobre un sustrato formado por una mezcla de tierra, arena de río lavada y materia orgánica en una proporción 2:1:1 o materia orgánica y zeolita en una proporción 2:1, depositada sobre un cantero bajo túnel, bolsas de polietileno, bolsas biodegradables, cajas de poliespumas u otro recipiente, pero siempre debe desinfectarse con bromuro de metilo o una solución de formalina al 5 % a razón de 5 L. Mantener con riegos ligeros la humedad óptima en las plantas producidas *in vitro* y limpiar de malezas hasta el trasplante final al campo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en la Biofábrica de Cienfuegos, ubicada en Carretera a Palmira Km 4, perteneciente a la UEB Semillas, provincia de Cienfuegos y en el Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), ubicado en el municipio Santo Domingo de la provincia Villa Clara, durante el período comprendido entre septiembre 2013 a mayo 2014.

3.1. Material Vegetativo

Se seleccionó el genotipo de 'Ñame Blanco o Guinea', teniendo en cuenta su potencial de rendimiento y su calidad para el consumo humano.

Descripción del clon

El clon de ñame 'Blanco o Guinea', presenta las siguientes características:

La planta presenta hojas acorazonadas-abarquilladas, enteras, paralelinervias, opuestas, verdes, la relación longitud-anchura oscila entre 1: 0,5-0,6, peciolo cilíndricos, el punto de inserción limbo-peciolo y el punto de inserción peciolo-tallo son de color verde, tanto en las hojas jóvenes como adultas. Posee tallos cilíndricos con espinas, verdes y se enrollan en sentido del puntero del reloj. Los tubérculos cilíndricos, castaño, piel rugosa, subepidermis crema, masa blanca, susceptible a la antracnosis. Requiere de tutor para la plantación.

Implantación y micropropagación del material vegetativo

Las plantas donantes para la propagación *in vitro* fueron seleccionadas del Banco de Germoplasma del INIVIT. Los tubérculos de cada planta típica fueron previamente caracterizados morfológicamente, según la lista de descriptores para la especie (IPGRI/IITA., 1997) y sanidad. Estos se seccionaron en fracciones de 120 a 150 g. Las fracciones de los tubérculos se plantaron en bolsas de polietileno que contenían compost como sustrato y posteriormente se cultivaron en un aislador (casa de cristal) por nueve meses. Después de cuatro semanas se realizó el corte de los tallos, los cuales se dividieron en segmentos nodales de aproximadamente tres centímetros de longitud, de forma tal que la yema axilar quedara en el centro. Luego los segmentos

nodales se lavaron con detergente comercial al 1% ($1,0 \text{ g.L}^{-1}$), se enjuagaron con abundante agua y posteriormente, en la cabina de flujo laminar se sumergieron en una solución de Hipoclorito de sodio (NaOCl) al 2,5% (v/v) por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo se enjuagaron con agua desionizada estéril por cinco veces (Medero *et al.*, 1999).

En la fase de establecimiento se utilizó el medio de cultivo basal MS que contiene, KIN ($1,0 \text{ mg.L}^{-1}$), ANA ($0,01 \text{ mg.L}^{-1}$) y $30,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarosa (Medero *et al.*, 1999). Esta fase de cultivo se desarrolló por un periodo de 30 días.

En la siguiente fase de multiplicación se empleo el medio de cultivo basal MS con $30,0 \text{ g.L}^{-1}$ de sacarosa y el cultivo se realizo cada 35 días, seccionando la planta *in vitro* en segmentos nodales con una yema axilar según la metodología propuesta por (Medero *et al.*, 1999).

En ambas fases de cultivo se colocó un segmento nodal con una yema axilar por tubo de ensayo (diámetro 25 mm y longitud 150 mm) que contenía 10,0 mL de medio de cultivo en estado semisólido con $5,0 \text{ g.L}^{-1}$ de agar-E (BIOCEN).

Las condiciones de cultivo empleadas para el establecimiento y la multiplicación de los segmentos nodales fueron las siguientes: cámaras de cultivo a $25 \pm 2,5^\circ\text{C}$ con una iluminación artificial mediante lámparas blancas fluorescentes (Sylvania, Daylight F 40T12/D 40 W) que proporciona una intensidad de $60 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. El fotoperiodo fue de 16 horas luz y ocho horas de oscuridad.

Para la entrega del clon seleccionado a la Biofábrica fueron utilizados tubos de cultivo con una microestaca de 1,5 a 2,0 cm de longitud, procedentes de plantas desarrolladas *in vitro*.

3.2. Procedimientos generales

El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C de temperatura y una presión de $1,2 \text{ Kg/cm}^2$; el tiempo de esterilización varió en dependencia del volumen de medio de cultivo, según información técnica de SIGMA (1991). Las placas Petri de 80 x 15mm para la manipulación del material desinfectado se esterilizaron por aire seco a 180°C durante 2 horas, empleando para este proceso una estufa (WS 200). La manipulación del material vegetal desinfectado, se realizó dentro de una cabina de flujo laminar horizontal.

Para la propagación *in vitro* en la Biofábrica, se utilizó el medio de cultivo basal "MS" propuesto por (Medero *et al.*, 1999). Estos materiales se sembraron en medio de cultivo gelificado con agar E (6,5 g.L⁻¹). En cada experimento se sembraron un total de 20 frascos por cada tratamiento y cada frasco contenía cinco explantes, los que se incubaron en condiciones de luz natural, con fotoperíodo de 14 horas luz y 10 de oscuridad, a una temperatura de 28±2 °C.

3.3. Evaluación de la micropropagación del genotipo de ñame en la Biofábrica

Los explantes del clon propagado *in vitro* y en tercer subcultivo fueron recibidos desde el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del INIVIT (Figura 1). En condiciones de Biofábrica estos materiales se sembraron en un medio de cultivo semisólido gelificado con agar E, se colocaron cinco explantes por frasco biotecnológico (pomos de 250 mL de volumen y magentas de 500 mL de volumen), los explantes se cortaron a 2,5 cm de altura, con dos yemas cada explante.



Figura 1. Material recibido desde el laboratorio del INIVIT, en tercer subcultivo.

3.3.1. Evaluación del efecto del tipo de esterilización sobre la propagación *in vitro* de ñame

Tipo de Esterilización:

1. **Química:** Se utilizó el Vitrofurul (G1) a razón de $0,114 \text{ g.L}^{-1}$ de medio de cultivo, según se recomienda en instructivo técnico suministrado por el fabricante. Para adicionar el Vitrofurul se esperó a que el medio de cultivo tuviera una temperatura aproximada entre $80\text{-}85 \text{ }^\circ\text{C}$, se disolvió primeramente el vitrofurul en 70 mL del medio de cultivo, y luego se incorporó al resto del medio agitando vigorosamente para lograr homogenización total y evitar sedimentación del producto.

El Vitrofurul (G-1) es un compuesto vinilfuránico que se obtiene de los residuos de la caña de azúcar, y está considerado una sustancia antimicrobiana con un amplio espectro de actividad (Quintana *et al.*, 2006).

2. **Física:** Se empleó una autoclave vertical J.P. Selecta, durante 20 minutos a una temperatura de $121 \text{ }^\circ\text{C}$ y una presión de 1,2 atm.

La evaluación se realizó a los 35 días de cultivo y se tuvo en cuenta las siguientes variables:

- Altura de las plantas *in vitro* (cm)
- Número de hojas de las plantas *in vitro*
- Coeficiente de multiplicación
- Porcentaje de contaminación

3.3.2. Evaluación del efecto del tipo de frasco sobre la propagación in vitro de ñame, durante tres subcultivos

Tipos de frascos de cultivo:

1. Frascos biotecnológicos (pomos de vidrio de 250 mL de volumen)
2. Magentas de 500 mL de volumen.

Se realizaron tres subcultivos cada 35 días y para la evaluación se tuvieron en cuenta las siguientes variables:

- Altura de las plantas *in vitro* (cm)
- Número de hojas de las plantas *in vitro*
- Coeficiente de multiplicación
- Porcentaje de contaminación

3.3.3. Aclimatización de plantas producidas *in vitro*

Para evaluar la respuesta de las plantas producidas *in vitro* durante la fase de aclimatización, se utilizaron las procedentes del sexto subcultivo. La plantación se realizó sobre un sustrato formado por cachaza bien descompuesta. Se emplearon dos tipos de contenedores:

- Bandejas de polieturano de 70 arviolos
- Bolsas de polietileno de 10x10cm

Se evaluó el porcentaje de supervivencia a los 15 días de la plantación.

Procesamiento estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados estadísticamente según el diseño experimental utilizado, el cual consistió en la aplicación de una prueba de hipótesis para muestras independientes en los casos que se compararon dos tratamientos. Se utilizó el paquete estadístico SPSS para *Windows* versión 15.0 y se aplicaron las pruebas no paramétricas clásicas de Mann-Whitney para la comparación de medias.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Evaluación del efecto del tipo de esterilización sobre la propagación *in vitro* del ñame

Para evaluar la metodología de micropropagación del ñame en la Biofábrica de Cienfuegos los explantes fueron transferidos en cabina de flujo laminar (Figura 2) al medio de cultivo de multiplicación, según el manejo establecido. Como resultado se obtuvo que a los 35 días de cultivo, los explantes colocados en el medio esterilizado con Vitrofurul (G1) y en autoclave alcanzaron una altura promedio sin diferencias significativas entre ellos (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados obtenidos para la variable altura de la planta producida *in vitro* de ñame con dos métodos de esterilización del medio de cultivo.

Métodos de esterilización	Altura promedio (cm)	Media de rango
Esterilización en autoclave	4,1	14,67
Esterilización con Vitrofurul	4,2	16,33
U de Mann-Whitney		100 ns



Figura 2. Secuencia del manejo del explante de ñame en el cuarto subcultivo.

Respecto a la variable número de hojas promedio, a los 35 días de cultivo se obtuvo como resultado que los explantes colocados en el medio esterilizado en autoclave alcanzaron un mayor número de hojas que los colocados el medio de cultivo esterilizado con Vitrofur, pero sin diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados obtenidos para la variable número de hojas de la planta producida *in vitro* de ñame con dos métodos de esterilización del medio de cultivo.

Métodos de esterilización	Número de hojas promedio	Media de rango
Esterilización en autoclave	3,6	17,60
Esterilización con Vitrofur	2,9	13,40
U de Mann-Whitney		81,00 ns

Otra de las variables evaluadas fue el coeficiente de multiplicación, donde para ambos métodos de esterilización se obtuvo el mismo coeficiente (3,1), sin diferencias significativas entre ellos (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados obtenidos para la variable coeficiente de multiplicación del ñame con dos métodos de esterilización del medio de cultivo.

Métodos de esterilización	Coficiente de multiplicación	Media de rango
Esterilización en autoclave	3,1	5,30
Esterilización con Vitrofur	3,1	5,70
U de Mann-Whitney		11,50 ns

Los resultados alcanzados en este experimento demostraron que puede utilizarse en el proceso de la micropropagación del ñame la esterilización química y/o física indistintamente con un buen desarrollo de los explantes y un coeficiente de multiplicación dentro del rango establecido para las biofábricas (Pérez *et al.*, 1998). Sin embargo, para el cultivo de la yuca no resultó factible el empleo del Vitrofur para la esterilización de los medios de cultivos (García, 2012).

Resulta meritorio señalar que se utilizará la esterilización química con Vitrofurul para la micropropagación del ñame porque con la aplicación del producto en la esterilización de los medios de cultivo se logró la eliminación del proceso de esterilización por calor húmedo con las autoclaves, lo cual trae consigo una disminución de los costos por ahorro de energía eléctrica y mano de obra.

Otros autores han obtenidos incrementos en el desarrollo de los cultivos de especies vegetales propagadas *in vitro* a las que se le aplica esterilización química con Vitrofurul en sustitución de la esterilización con autoclave (Agramonte *et al.*, 2006, Quiala *et al.*, 2002, Quintana *et al.*, 2006). Dicha respuesta *in vitro* debe tener su explicación porque muchos de los componentes del medio de cultivo son afectados por las altas temperaturas que se emplean para la esterilización (Pérez *et al.*, 1998). Además, los resultados alcanzados mostraron que el Vitrofurul brinda la protección necesaria al cultivo *in vitro*, sin presentarse síntomas de fitotoxicidad, lo cual ha sido observado también en estudios realizados por Jiménez *et al.* (2003) mediante el empleo del G1 como esterilizante químico.

4.3.2. Evaluación del efecto del tipo de frasco sobre la propagación *in vitro* de ñame, durante tres subcultivos

En todo proceso de micropropagación resulta de elevada importancia definir los requerimientos tecnológicos donde mejor responde el cultivo a propagar.

Durante el **cuarto subcultivo**, al evaluar las variables definidas, se obtuvo como resultado un incremento de la altura promedio (3,3) al utilizar los pomos de vidrio sin diferencias significativas con las plantas desarrolladas en las magentas de plástico (2,8) (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados obtenidos para la variable altura de la planta producida *in vitro* de ñame con dos tipos de frascos de cultivo, cuarto subcultivo.

Frascos de cultivo	Altura promedio (cm)	Media de rango
Magenta	2,8	10,58
Pomos de vidrio	3,3	14,42
U de Mann-Whitney		49,00 ns

Para la variable número de hojas, fue encontrada una respuesta similar (Tabla 5), donde se puede observar que cuando se utilizó el frasco de cultivo (Pomos de vidrio de 250 ml de volumen) se alcanzó el mayor número promedio por planta *in vitro* (3,3), sin diferencias estadísticas respecto a los resultados obtenidos con las magentas de 500 ml de volumen.

Tabla 5. Respuesta de la variable número de hojas de la planta producida *in vitro* de ñame con dos tipos de frascos de cultivo, cuarto subcultivo.

Frascos de cultivo	Número de hojas promedio	Media de rango
Magenta	2,3	9,75
Pomos de vidrio	3,3	15,25
U de Mann-Whitney		39,00 ns

Durante este subcultivo, no se encontraron diferencias estadísticas para el coeficiente de multiplicación (Tabla 6). Se puede observar que el mejor resultado se obtuvo con los explantes propagados en los pomos de vidrio de 250 ml de volumen con el mayor valor numérico (3,4) con mayores valores medios respecto al material propagado en las magentas (2,0).

Tabla 6. Resultados obtenidos para la variable coeficiente de multiplicación del ñame con dos tipos de frascos de cultivo, cuarto subcultivo.

Frascos de cultivo	Coeficiente de multiplicación	Media de rango
Magenta	2,0	3,40
Pomos de vidrio	3,4	7,60
U de Mann-Whitney		2,00 ns

En el **quinto subcultivo** de micropropagación, la respuesta obtenida fue diferente a la observada hasta el momento. Respecto a variable altura de la planta *in vitro* el mejor resultado se obtuvo al utilizar los pomos de vidrio con diferencias altamente significativas respecto a las magentas utilizadas (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados obtenidos para la variable altura de la planta producida *in vitro* de ñame con dos tipos de frascos de cultivo, quinto subcultivo.

Frascos de cultivo	Altura promedio (cm)	Media de rango
Magenta	0,4	6,88
Pomos de vidrio	4,7	18,13
U de Mann-Whitney		4,50**

En cuanto a la variable número de hojas, el mejor resultado y con diferencias altamente significativas se obtuvo al utilizar los pomos de vidrio de 250 ml de volumen con un valor promedio de 4,3 hojas por planta *in vitro* en comparación con las plantas desarrolladas en las magentas (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados obtenidos para la variable número de hojas de la planta producida *in vitro* de ñame con dos tipos de frascos de cultivo, quinto subcultivo.

Frascos de cultivo	Número de hojas promedio	Media de rango
Magenta	0,2	6,58
Pomos de vidrio	4,3	18,42
U de Mann-Whitney		1,00**

Al evaluar el coeficiente de multiplicación, el mejor resultado se obtuvo al utilizar los pomos de vidrio (3,5) con diferencias altamente significativas con respecto al otro tipo de frasco estudiado (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados obtenidos para la variable coeficiente de multiplicación del ñame con dos tipos de frascos de cultivo, quinto subcultivo.

Frascos de cultivo	Coeficiente de multiplicación	Media de rango
Magenta	0,2	3,00
Pomos de vidrio	3,5	8,00
U de Mann-Whitney		0,00**

En la Figura 3, se puede observar el desarrollo *in vitro* de las plantas propagadas en ambos tipos de frascos hasta el quinto subcultivo.



A. Plantas propagadas en magentas de 500 ml de volumen

B. Plantas propagadas en pomos de vidrio de 250 ml de volumen

Figura 3. Efecto del tipo de frasco en la micropropagación del clon ñame 'Blanco de Guinea'.

Las evaluaciones realizadas durante el **sexto subcultivo**, se encontró que las plantas *in vitro* propagadas en las magentas no desarrollaron y el proceso de micropropagación del ñame solo se logró cuando se utilizaron pomos de vidrio de 250 ml de volumen. En la Tabla 10, se presentan los resultados obtenidos para las variables evaluadas, donde se alcanzó un coeficiente de multiplicación de 3,0 con plantas vigorosas que se caracterizaron por alcanzar una altura promedio de 3,2 cm y un número de hojas de 3,6 por plantas *in vitro*.

Tabla 10. Resultados obtenidos para las variables evaluadas durante el sexto subcultivo en la micropropagación del ñame.

Frascos de cultivo	Altura promedio (cm)	Número de hojas promedio	Coefficiente de multiplicación
Pomos de vidrio	3,2	3,6	3,0

Otro aspecto a tener en cuenta durante la puesta a punto de una metodología de micropropagación lo constituye el porcentaje de pérdida por contaminación.

En la Figura 4, se puede observar que cuando se utilizaron pomos de vidrio como frascos de cultivo los porcentajes de contaminación oscilaron entre 1,0 y 2,5%, mientras que en las magentas las pérdidas por contaminación se incrementaron desde un 50% en el cuarto subcultivo hasta el 100% en el sexto.

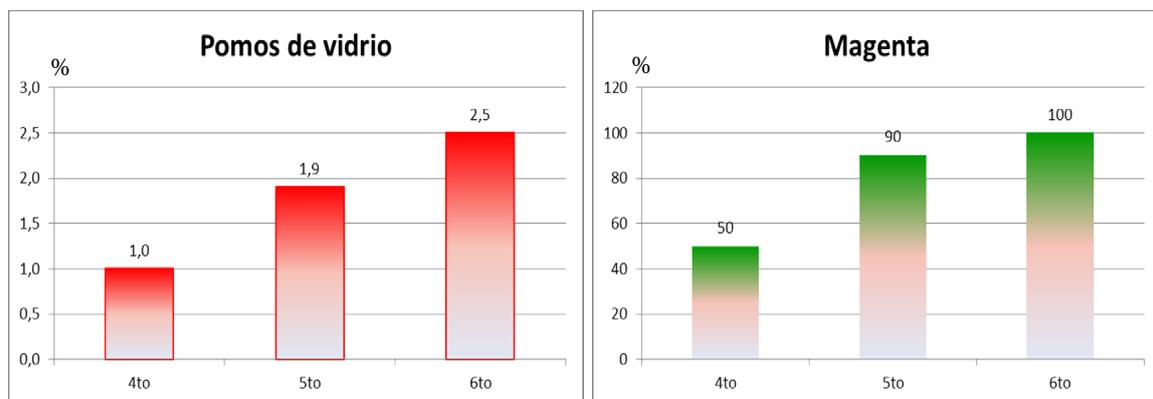


Figura 4. Porcentaje de contaminación en la micropropagación del ñame 'Blanco de Guinea' durante tres subcultivos en dos tipos de frascos.

Los porcentajes de contaminación cuando se utilizaron los pomos de vidrio se mantuvieron dentro del rango permisible para la implementación de una metodología de micropropagación a escala productiva en biofábricas, el cual no debe superar el 10% (Pérez *et al.*, 1998).

De forma general, en este experimento la mejor respuesta se obtuvo al utilizar los pomos de vidrio de 250 ml de volumen con relación a las magentas plásticas. Esta

respuesta puede estar muy relacionada con la transparencia y las longitudes de onda que dejan pasar ambos frascos. Al respecto, Freshney (1995), planteó que los frascos tanto de vidrio como plástico proveen condiciones favorables para el crecimiento y anclaje celular, sin embargo los resultados obtenidos mostraron para el cultivo del ñame una respuesta diferente en el tiempo durante subcultivos sucesivos.

4.3.3. Aclimatización de las plantas producidas in vitro de ñame

El porcentaje de supervivencia de las plantas producidas *in vitro* del clon de ñame 'Blanco de Guinea' con los tipos de contenedores (bandejas de polieturano de 70 arviolos y bolsas de polietileno) en fase de aclimatización, se presentan en las Figuras 5 y 6.

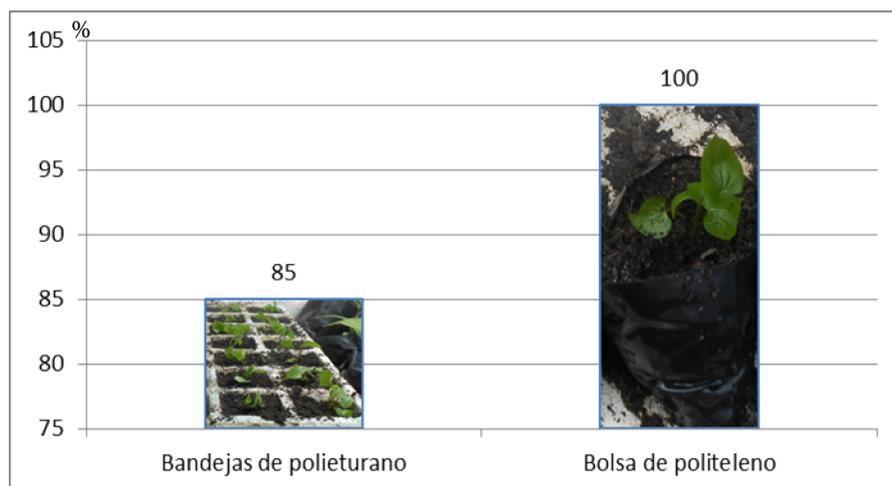


Figura 5. Porcentaje de supervivencia en dos tipos de contenedores, a los 15 días de la aclimatización.

Como se puede observar el mayor porcentaje de supervivencia se alcanzó cuando se utilizaron bolsas de polietileno (100%), mientras que al utilizar las bandejas de polieturano fue de un 85%.



Figura 6. Plantas producidas *in vitro* del clon 'Blanco o Guinea', a los 15 días de aclimatización en la Biofábrica de Cienfuegos.

Como se conoce, alcanzar un alto porcentaje de supervivencia durante la fase de aclimatización es importante para reducir el costo de la producción de las plantas *in vitro* y además, es necesario para garantizar el éxito en la adopción de la metodología por las Biofábricas.

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que para la aclimatización del ñame se requiere mantener una alta humedad relativa durante los primeros diez días después del trasplante para lograr mayor éxito en esta fase. Otro factor importante lo constituye el desarrollo de la planta producida *in vitro* al momento del trasplante ya que la calidad del material vegetal *in vitro* tiene gran influencia en el porcentaje de supervivencia *ex vitro*.

Estos resultados demuestran que los primeros 15 días representan el período crítico en el proceso de aclimatización de las plantas producidas *in vitro* de ñame, en ellos debe tomarse las medidas que eviten la transpiración descontrolada característica del material que entra a la fase de aclimatización y proveniente de condiciones *in vitro* (Cabrera *et al.*, 1999, Medero, 2006 y Paz, 2012), para lo cual es determinante lograr que mantenga una alta humedad relativa y garantizar su reducción gradual para favorecer la formación, adaptación y funcionalidad de las estructuras involucradas en el control de la relación hídrica y en el incremento de la actividad metabólica conducente al fotoautotrofismo (Desjardins, 1995). Es conocido, que el estrés del trasplante es fundamentalmente por el estrés hídrico, el poco desarrollo de la cera cuticular y estomático lo que provocan la deshidratación de las plantas llevadas a fase de aclimatización (Morán, 2008). Finalmente, se puede afirmar que

lograr las condiciones de luz, temperatura y humedad para alcanzar porcentajes altos de supervivencia durante el trasplante del material *in vitro* a condiciones *ex vitro* constituye un factor primario que debe garantizarse en el establecimiento de una metodología de aclimatización (Preece y Sutter, 1991).

5. CONCLUSIONES

1. Se implementó la micropropagación del clon de ñame 'Blanco de Guinea' en la Biofábrica de Cienfuegos, donde se logró el adiestramiento de los técnicos en el manejo de los explantes y permitió alcanzar coeficientes de multiplicación aceptables con pérdidas por contaminaciones dentro del rango permisible para estas entidades.
2. El uso de la esterilización química con Vitrofurul (G1) del medio de cultivo fue factible para la micropropagación del ñame.
3. Se determinó que los pomos de vidrio de 250 mL de volumen constituyen el mejor frasco de cultivo para la propagación *in vitro* del ñame.
4. Se lograron porcentajes de supervivencia superiores al 85% en los contenedores estudiados.

6. RECOMENDACIONES

- Aplicar los resultados obtenidos en la Biofábrica de Cienfuegos para producir el material de plantación de alta calidad genética y fitosanitaria que la provincia necesita para la producción de semillas de este cultivo.
- Implementar la experiencia adquirida en otras entidades de su tipo a nivel nacional.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agramonte, D., F. Jiménez; M. A. Dita. (1998). Aclimatización. En: Pérez Ponce, J. N. (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Instituto de biotecnología de las plantas. Sta. Clara, Villa Clara. Cuba. pág. 193-206.
- Agramonte, D. y col. (2006). Biofábricas para la micropropagación de especies vegetales. Forum de Ciencia y Técnica 2006, Provincial. Villa Clara. 11p.
- Akita, M.; T. Shigeokka; Y. Y. Kooizumi; M. Kawamura. (1994). Mass propagation of shoots of stevia rebaudiana using a large scale bioreactor. Plant Cell Reports, 13: 180-183.
- Amusa N, Adegbite A, Amammeda S & Baiyewu RA. (2003). Yam diseases and its management in Nigeria. African Journal of Biotechnology. Vol. 2 (12): 497-502.
- Bazaldú, M.; Zapata, C. V.; Morales, V. S.; Maldonad, G. y U. López, (2008). Densidad estomatal y potencial hídrico en plantas de tomate (*Physalis ixocarpa* Brot.), propagadas por cultivo de meristemas. Revista Chapingo Serie Horticultura 14(2): 147-150.
- Borges M.; Meneses S.; Aguilera N. y Vázquez J. (2004). Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 76 (1): 87-89.
- Cabrera, M.; Medero, V.; García, M.; Espinosa, E.; López, J.; Ventura, J.; Del Sol, L.; Oliva, M.; Toledo, H. y Y. Torres, (1999). Aclimatización de vitroplantas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Libro de Reportes Cortos, Quinto Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal, 16-19 de Junio, 1999. Instituto de Biotecnología de las Plantas; Santa Clara, IBP. pp. 170-171.
- Cabrera, M. y col. (2003). Establecimiento y multiplicación *in vitro* del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea rotundata* Poir.). CD-ROM Memorias de BioVeg 2003. Ciego de Avila: Centro de Bioplantas; 17-21 Abril del 2003. ISBN: 959-16-0169-7.

- Cabrera, M. (2009). Empleo de métodos biotecnológicas para la propagación de ñame. *Biotecnología Vegetal* 9(4):195 – 209.
- Cabrera, M., Gómez R., Rayas A., DeFeria, M. López J., Basail M., 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), p. 19-30.
- Chen, FY, Wang D, Gao X y Wang L. (2007). The effect of plant growth regulators and sucrose on the micropropagation of *Dioscorea nipponica* makino. *Plant Growth Regulation* 26:38-45.
- Conner, L. N. y Conner, A. J. (1984). Comparative waterloss from leaves of solanum lacinated plants cultured *in vitro* and *in vivo*. *Plant. Sci. Let.*, (36), 241-246.
- Desjardins, Y., (1995). Factors affecting CO₂ fijation in striving to optimize photoautotrophy in micropropagated plantlets. *Plant Tissue Cult. Biotech.*
- Donan, A. (1991). *Establishment of tissue culture grown in that greenhouse enviroment*. Proceedigs Florida State Horticultural Society.
- FAOSTAT. (2012). Disponible en: <http://www.fao.org>. Consultado: 18 de marzo de 2014.
- Freshney, R.I. (1995). *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique*. Third Edition. 486 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. Wiley-Liss, a John Wiley and Sons, Inc., Publication. New York, Chichester, Brisbane, Toronto. Singapore. Volume 39, Issue 2, pág. 184–185.
- García, R. (2012). Escalado de la propagación *in vitro* de la yuca en la Biofábrica de Cienfuegos. Tesis para optar por grado de Ingeniero Agrónomo, Universidad de Cienfuegos “Carlos Rafael Rodríguez”, 34p.
- González, M.E. (2012). El Ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*. La Habana oct.-dic. 33 (4): 5-15.
- Hu, C.V., & Wang, J.P. (1983). Meristem, shoot tip and bud culture. *Handbook of Plant Cell Culture*. New York: Macmiiian Publishing. p. 177-227.

- IPGRI/IITA. (1997). Descriptores para el ñame (*Dioscorea* spp.). Instituto Internacional del Agricultura Tropical, Ibadán, Nigeria/ Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.
- Jiménez, E. (1998). Generalidades del cultivo *in vitro*. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba. pág. 13-22.
- Jiménez, E. y M. De Feria. (1998). Empleo de biorreactores para la Propagación Masiva. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Santa Clara. Cuba. pág. 207-222.
- Jiménez, R y Caballero, M. (1990). El cultivo industrial de plantas en macetas. Ediciones. (Horticultura). Madrid.
- Jiménez, C., Mayra Matos, Penélope Galindo, Maribel Colmenares. (2003). Esterilización química y sustitución de filtros comerciales en recipientes prototipos para inmersión temporal. Ecofisiología y Fisiología vegetal. Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Biotecnología Vegetal. p. 96.
- Jiménez, E. (2009). Conferencia sobre propagación vía organogénesis, fase III enraizamiento y fase IV aclimatización. Presentado en la Novena edición de la Maestría en Biotecnología Vegetal, Santa Clara, Cuba.
- Medero, V. y col. (1997a). Producción de microbulbillos "in vitro" de ñame (*Dioscorea alata* y *Dioscorea bulbifera*). Agrotecnia de Cuba 27(1):157-159.
- Medero, V.; M. García; J. López; J. de la C. Ventura; S. Rodríguez y C. Rodríguez (1997b). Metodología para la propagación *in vitro* del ñame (*Dioscorea alata*). Plegable, Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT).
- Medero V., Del Sol L. y García M. (1999). Metodología para la propagación del clon de ñame 'Blanco o Pelú'. Resúmenes del BioCat 99, Granma Cuba 5-7 de Octubre p. 12.
- 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. 101 p.

- Millar, D. (1983). Weaning and growing-on of micropropagated plants. Proceeding of the international plant propagation society. pág. 253-256.
- Morán, P. (2008). Implementación de técnicas de aclimatización para plantas micropropagadas de Vid (*Vitis vinifera* L.). Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.
- Morita, A. (1992). A critical moment for japanese managenet. Economic Eye Autumn. pág 4-9.
- Murashige, T.; F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*. 15:473-497.
- Nava, J. (2008). Propagación *in vitro* y establecimiento en invernadero de las orquídeas *Trichocentrum carthagenense (jacq.) Sw.* y *Laelia eyermaniana rchb. F.* para su conservación y potencial aprovechamiento sustentable. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, Morelos, México. 96 p.
- Orellana, P. (1998). Introducción a la Propagación Masiva. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Sta. Clara, Cuba. pág. 125-133.
- Ovono, P.O, Kevers C & Dommès J. 2007. Axillary proliferation and tuberization of *Dioscorea cayenensis-D. rotundata* complex. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 91: 107-114.
- Perea, M. (2000). Utilización de los sistemas *in vitro* para la obtención de plantas de ñame (*Dioscorea* spp.) libres de patógenos. En: Ñame: Producción de semillas por Biotecnología. M. Guzmán Barney y G. Buitrago Hurtado (Eds) Editorial Unibiblos – Santafé de Bogotá. p. 41-54.
- Perea, M. (2001). Contribución de la biotecnología al desarrollo sostenible del cultivo del ñame. En: Perea, M. (Ed). Biotecnología Agrícola. Bogotá, D.C., Colombia. pp. 289-301.
- Pérez, J., Jiménez, E., & Agramonte, D. (1998). Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez, J. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas. Sta. Clara, Cuba. Pág. 179-190.

- Pérez, J., Suárez, M., & Orellana, P. (2000). Posibilidades y potencial de la Propagación Masiva de Plantas en Cuba. *Bioteconología Vegetal*, 1, 3-12.
- Preece, J.E. & Sutter, E.G. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *Micropropagation: Technology and application*. Kluwer: Kluwer academic publishers, Dordrecht. pág. 71-93.
- Quesada, L. (1994). Manejo de plantas en invernadero. Primer Curso FAO, Francia-Cuba sobre técnicas de micropropagación *in vitro*. FAO. 6 p.
- Quijala, Elisa, Jiménez, E., De Fera, M., Alvarado, Yelenis, Chávez, Maité, Agramonte, D., Ramírez, Daymí, Acosta, Mayra, Pérez, Nayvi y Capote, Alina. (2002). Empleo del Vitrofurcal en la esterilización química del endospermo artificial de los embriones somáticos encapsulados de *Saccharum* spp. híbrido var. Cuba 87- 51. *Bioteconología Vegetal*, 2(4): 221-226.
- Quintana, M.; J.A. Nápoles; B. Salas; L. Ulloa; Y. Galdo y A. Carbonell. (2006). Perfeccionamiento en la producción *in vitro* de leguminosas para la alimentación animal. XVI Forum de Ciencia y Técnica Provincial. Sancti Spíritus. 17p.
- Roca, W.M. (1991). Cultivo de Tejidos en la Agricultura Tropical. Editorial Cali, Colombia.
- Rodríguez, M.J. (1990). Aplicación de las Técnicas de Cultivo *in vitro* para la producción de plantas plataneras en las islas canarias. *Revista Agrícola Vergel*, (99), 190-197.
- 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.
- Santamaría, J.; K. Murphy; C. Leifert; P. Lumsden (2000). Ventilation of cultured vessels: I. Increased water movement rather than reduced concentrations of ethylene and CO₂ is responsible for improved growth and development of

- Delphinium *in vitro*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 75(3): 320-327.
- Sanz de Galdeano, J. (1990). Invernaderos y túneles. Revista agrícola vergel (España), 106: 742-748.
- Scott G, Rosegrant M y 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).
- SIGMA. 1991. Catalogue Sigma Chemical Company. USA.
- Sosa, F.; Ortiz, M.; Hernández, R. S.; Armas, R. P. y D. S. Guillen, (2009). Propagación *in vitro* de Heliconia Stanley Mac bride en Cuba. Revista Chapingo Serie Horticultura 15(2): 17-23.
- Suárez, M., & Alvarado, Y. (1997). Sistema de control de calidad para las Biofábricas de múltiples cultivos. *Libro de resúmenes. Técnicas de avanzadas aplicadas a la propagación masiva de plantas. BIOVEG 97* (págs. 2-5). Ciego de Ávila: Universidad de Ciego de Ávila.
- Sutter, E. (1988). Stomatal and cuticular waxes loss from apple, cherry and sweetgum plants alter renewal from culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*, 113, 234-238.
- 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.
- Vasil, I. (1994). Automation in Plant Propagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39(2), 105-108.
- Villalobos, V.M. y T.A. Thorpe. (1991). Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. *En: Roca, W.M.; L. A. Mroginski. (Ed.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura.* CIAT. Colombia, pág. 128-141.
- Viñas, S. (1994). La Ingenierización y la Ingeniería Concurrente en los proyectos de la Industria Farmacéutica y la Biotecnología. *Revista Producao. Brasil*, 4(2), 117-120.
- Vuylsteke, D. and E. De Langhe. 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. *Trop Agric (Trinidad)*. 62: 323-328.

- Yue, D.; Gossellin, A. y Y Desjardins, (1993). Effects of forced ventilation at different relative humidities on growth, photosynthesis and transpiration of geranium plantlets *in vitro*.
- Ziv, M. (1986). *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: Whithers L. A. Alderson P. G. (Eds). Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications. Butterworths, London. págs. 187-196.
- Ziv, M., Schwartz, A., & Fleminger, D. (1987). Malfunctioning stomata in vitreous leaves of carnation (*Dianthus caryophyllus*) plants propagated *in vitro*; implications for hardening. *Plant sci.*, 52, 127-134.
- Ziv, M. (1989). Enhanced shoot and corolla proliferation in liquid cultured Gladiolus Buds by Growth Retardants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 17: 101-110.