

CONSERVACIÓN *IN VITRO* DE CULTIVARES DE ÑAME (*Dioscorea alata* L.) BAJO CONDICIONES DE CRECIMIENTO MÍNIMO

Aymé Rayas Cabrera*, Jorge López Torres, Víctor R. Medero Vega, Milagros Basail Péres, Arletys Santos Pino y Marilín Martínez Pérez.

Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo, CP 53000, Villa Clara, Cuba.

*Autora para la correspondencia: conserv.biotech@inivit.cu.

Recibido: 18 de marzo de 2020; Aceptado: 10 de junio de 2020

RESUMEN

El cultivo de tejidos vegetales constituye una alternativa para la conservación del germoplasma de especies que son propagadas vegetativamente. Su utilización permite mantener las colecciones en pequeños espacios, libres del ataque de enfermedades y catástrofes, además de facilitar el intercambio de germoplasma. El tejido empleado para la conservación *in vitro* debe permitir tanto el establecimiento, la regeneración de plantas en un amplio rango de genotipos y una alta estabilidad genética. El presente trabajo se realizó en el período comprendido desde abril del 2017 hasta febrero del 2018, con el objetivo de establecer los medios de cultivo para la conservación *in vitro* en condiciones de crecimiento mínimo en cultivares de ñame de la especie *Dioscorea alata* (L.). Se seleccionaron cuatro cultivares y se estudiaron cinco variantes de medio de cultivo que incluyen diferentes concentraciones del medio basal de Murashige y Skoog (1962) (25, 50 y 100 %) y de manitol (0,75; 1,5 y 3,0 %). Se evaluó a los cinco y diez meses, la longitud del explante y el número de brotes formados. Se mantuvieron conservadas durante 10 meses y se evaluó la regeneración de las plantas conservadas *in vitro*. En el medio de cultivo que contiene 50 % de las sales y vitaminas MS; 3,0 % de manitol; 20 g.L⁻¹ de sacarosa y 1,0 g.L⁻¹ de carbón activado fue posible conservar por mayor tiempo sin subcultivar. Las plantas *in vitro* mostraron las características buscadas para crecimiento mínimo: hojas pequeñas, brotes múltiples y entrenudos cortos y se regeneraron sin dificultad.

Palabras clave: cultivo de tejidos, manitol

IN VITRO CONSERVATION OF YAM CULTIVARS (*Dioscorea alata* L.) UNDER MINIMUM GROWTH CONDITIONS

ABSTRACT

The culture of plant tissues is an alternative for the species germplasm conservation which are vegetative propagated. Its use allows keep collections in small areas, free from the attack of diseases and natural disasters, besides it facilitates the germplasm exchange. The tissue used for *in vitro* conservation should permit the establishment, the regeneration of plants in a wide genotype range and a high genetic stability. This work was carried out in the period from April 2017 to February 2018 with the objective of establishing the culture mediums for *in vitro* conservation under minimum growth conditions of yam cultivars of the species *Dioscorea alata* (L.). Four cultivars were selected and five variants of culture medium were studied that include different concentrations of the basal medium of Murashige and Skoog (1962) (25, 50 and 100 %)

and of mannitol (0,75; 1,5 and 3,0 %). The explant length and the number of buds formed were evaluated at five and ten months. They were preserved for 10 months and the regeneration of plants preserved *in vitro* was evaluated. In the culture medium containing 50 % of salts and MS vitamins; 3,0 % of mannitol; 20 g.L⁻¹ of sucrose and 1,0 g.L⁻¹ of activated charcoal was possible to preserve for a longer time without subculturing. The *in vitro* plants showed the characteristics sought for minimum growth: small leaves, multiple buds and short internodes, and they were regenerated without any difficulty.

Keywords: tissue culture, mannitol

INTRODUCCIÓN

El cultivo del ñame es una importante fuente de alimento para una gran parte de la población en las regiones tropicales, es considerado el segundo cultivo en eficiencia para producir energía asimilable, solamente superado por la papa (Scott *et al.*, 2000). En la zona del Caribe, la producción anual se estima en alrededor de 693 000 t (FAO, 2017). Dentro de las más de 600 especies del género *Dioscorea*, la especie *Dioscorea alata* L. es una de las más cultivada en Cuba y en el mundo.

Cuba, a pesar de la considerable disminución en la producción de este cultivo, es el tercer productor de ñame en la zona del Caribe (52 881 t), con un 7,63 % de la producción total, después de Haití (63,4 %) y Jamaica (20,82 %) (FAO, 2017), donde representa la principal fuente de seguridad alimentaria (Pérez *et al.*, 2015). Se cultiva tradicionalmente en las regiones oriental y central del país. Esta especie desde que se comenzó a explotar por el hombre, se propaga de forma agámica por fracciones de tubérculos, las que, al plantarse de un año para otro en campo, pueden ir acumulando microorganismos patógenos (Rodríguez, 2000), por estas razones el cultivo *in vitro* es una opción importante en su propagación. Borges *et al.* (2015) demostraron que es posible la plantación de ñame en varias épocas del año a partir de plantas *in vitro* aclimatizadas, lo que permite potenciar el incremento de la producción sostenible del cultivo, por su parte Balogun *et al.* (2017) y Rodríguez *et al.* (2019), compararon la eficacia relativa del cultivo de tejidos y la selección positiva para generar materiales de plantación de ñame libres de patógenos y recomiendan el uso de las técnicas de cultivo *in vitro*, que incluye la producción de minitubérculos, a nivel comercial. Sánchez *et al.* (2019) también resaltaron el valor de las plantas producidas *in vitro* a nivel comercial.

La diversidad genética representada por variedades de cultivos y sus parientes silvestres es un tesoro que debe compartirse equitativamente a través de las fronteras (CIAT, 2004). En el caso del ñame es de gran interés el mantenimiento de genotipos de valor para el mejoramiento. Sin embargo, la conservación en campo consume gran espacio y es laboriosa además de estar expuesta al ataque de enfermedades como la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. que es, en las condiciones de Cuba, la de mayor incidencia y que reduce considerablemente los rendimientos (MINAG, 2018).

En el caso de los cultivos de propagación vegetativa es conveniente utilizar una combinación de técnicas de almacenamiento en lugar de depender de una sola. (Roca, 1994). El cultivo de tejidos vegetales constituye una alternativa para la conservación del germoplasma de especies que son propagadas vegetativamente. Su utilización permite mantener las colecciones en pequeños espacios, libres del ataque de enfermedades y catástrofes, además de facilitar el intercambio de germoplasma. En el cultivo del ñame

es aconsejable la combinación de métodos tradicionales con técnicas modernas, para detener el deterioro del material vegetal y conservar la variabilidad genética, como la introducción de la micropropagación y conservación *in vitro*, aplicada con éxito por varios autores (Borges *et al.*, 2011; Carmona *et al.*, 2013; Aighewi *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2015).

El presente trabajo tuvo como objetivo establecer los medios de cultivo para la conservación *in vitro* en condiciones de crecimiento mínimo de cultivares de ñame (*Dioscorea alata* L.).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en la Unidad de Conservación *in vitro* del laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), desde abril del 2017 hasta febrero del 2018.

Se emplearon como explantes segmentos nodales con una yema axilar de cuatro cultivares de ñame (*Dioscorea alata* L.): 'Blanco o Pelú', 'Ñame de caballo', 'Cartagena' y 'Búfalo de agua' certificados como libres de enfermedades virales, en tercer subcultivo, previamente multiplicados en un medio de cultivo compuesto por las sales inorgánicas y vitaminas propuestas por Murashige y Skoog (1962) (MS), complementado con cisteína (20 mg.L⁻¹); 30,0 g.L⁻¹ de sacarosa y 5,0 g.L⁻¹ de Agar-E (Biocen). El pH fue ajustado a 5,7 con NaOH 0,5 N o HCl 0,5 N antes de la esterilización por 20 minutos en autoclave vertical (BK75).

Las condiciones de cultivo fueron: temperatura 27 ± 2 °C y régimen de 16 horas luz por día (DFFF de 62-68 μmol m⁻²s⁻¹).

En los experimentos se aplicó un diseño completamente aleatorizado por entender homogéneas las condiciones de cultivo dentro de las cámaras y considerar como única fuente de variación los tratamientos.

Para el procesamiento de los datos se empleó el paquete estadístico SPSS ver. 15.0 para Windows, en cada experimento se detallan las pruebas realizadas.

Para el estudio de medios de cultivo se utilizaron cinco variantes que consistieron en concentraciones de las sales MS (Murashige y Skoog, 1962), 20 g de sacarosa, 1,0 g.L⁻¹ de carbón activado, pH 5,7 y concentraciones de manitol (regulador osmótico) en las combinaciones siguientes:

Tratamientos

- I. 25 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol,
- II. 50 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol,
- III. 100 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol,
- IV. 50 % de las sales y vitaminas MS, 0,75 % de manitol,
- V. 50 % de las sales y vitaminas MS, 3,0 % de manitol.

Se colocaron 20 tubos por tratamiento

Se evaluó a los cinco y diez meses la longitud del explante y el número de brotes formados.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó una comparación múltiple de medias según Dunnett-C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar los explantes conservados a los cinco meses (Tabla 1) pudimos apreciar que se mantenían en muy buenas condiciones físicas y con poco crecimiento, el tratamiento

IV fue el que alcanzó la mayor longitud del tallo y en el tratamiento V fue el de menor crecimiento (1,21 cm).

Tabla 1. Efecto de los tratamientos sobre la longitud del tallo a los 5 meses de conservados.

Tratamientos Cultivares	I	II	III	IV	V	$\bar{X}$
'Blanco o Pelú'	3,15 cd	2,90 d	1,90 efg	3,30 cd	1,25 fg	2,50 b
'Ñame de caballo'	3,20 cd	2,42 de	2,40 de	3,67 b	1,05 g	2,75 b
'Cartagena'	2,00 ef	1,33 fg	1,30 fg	3,20 cd	1,30 fg	1,82 c
'Búfalo de agua'	3,90 bc	3,22 cd	1,63 efg	4,60 a	1,26 fg	3,32 a
$\bar{X}$	3,06 b	2,47 c	1,80 d	4,44 a	1,21 e	

EScultivares $\pm 0,14$ ESmedios $\pm 0,12$ ESinteracción $\pm 0,28$ CV = 21,75 %

Leyenda: I. 25 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; II. 50 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; III. 100 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; IV. 50 % de las sales y vitaminas MS, 0,75 % de manitol; V. 50 % de las sales y vitaminas MS, 3,0 % de manitol.

En cuanto al número de brotes, a los cinco meses (Tabla 2) el tratamiento IV (1,68) fue el de menor valor sin diferencias con el tratamiento I (2,14).

Tabla 2. Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes a los 5 meses de conservados.

Tratamientos Cultivares	I	II	III	IV	V	$\bar{X}$
'Blanco o pelú'	2,25 bcd	3,00 b	2,25 bcd	1,75 bcd	2,50 bc	2,35 ab
'Ñame de caballo'	2,00 b	2,50 a	4,25 a	2,00 bcd	2,75 b	2,70 a
'Cartagena'	3,00 b	3,53 bc	3,00 b	2,00 bcd	2,00 bcd	2,50 ab
'Búfalo de agua'	1,32 cd	2,75 b	2,00 bcd	1,00 d	3,00 b	2,01 b
$\bar{X}$	2,14 bc	2,68 ab	2,87 a	1,68 c	2,65 ab	

EScultivares $\pm 0,14$ ESmedios $\pm 0,12$ ESinteracción $\pm 0,28$ CV = 21,75 %

Leyenda: I. 25 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; II. 50 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; III. 100 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; IV. 50 % de las sales y vitaminas MS, 0,75 % de manitol; V. 50 % de las sales y vitaminas MS, 3,0 % de manitol.

Transcurridos 10 meses pudimos apreciar que las plántulas aún se conservaron en buenas condiciones (Tabla 3) destacándose el tratamiento V (50 % de las sales y vitaminas MS, 3,0 % de manitol, 20 g de sacarosa, 1,0 g.L⁻¹ de carbón activado y pH 5,7) con la menor altura promedio (3,16 cm) sin diferencias estadísticas entre los cultivares.

Los resultados evidencian que la variable longitud del tallo presentó diferencias estadísticamente significativas en el tratamiento V, donde se obtuvieron los valores más reducidos, con el resto de los tratamientos. Por esta razón, es considerado adecuado para la conservación *in vitro* de cultivares de esta especie. Lo anterior se debe a la disminución del potencial osmótico e hídrico del medio de cultivo por el efecto del manitol, lo cual dificulta la absorción de agua y nutrientes, ocasionando una reducción

en el crecimiento de la planta, este fenómeno, también ha sido observado en las investigaciones realizadas por Carmona *et al.* (2013).

Tabla 3. Efecto de los tratamientos sobre la longitud del tallo a los 10 meses de conservados.

Tratamientos Cultivares	I	II	III	IV	V	$\bar{X}$
'Blanco o Pelú'	3,82 ab	3,37 ab	2,62 ab	4,62 a	1,65 b	3,26 a
'Ñame de caballo'	3,25 ab	2,42 ab	3,05 ab	4,50 a	4,35 a	3,51 a
'Cartagena'	4,35 a	3,42 ab	3,95 ab	3,72 a	2,75 ab	3,64 a
'Búfalo de agua'	3,25 ab	3,70 ab	3,75 ab	3,42 ab	3,92 ab	3,67 a
$\bar{X}$	3,74 ab	3,23 ab	3,34 ab	4,11 a	3,16 b	
EScultivares $\pm$ 2,06ns ESmedios $\pm$ 0,23* ESinteracción $\pm$ 0,46** CV = 26 %						

Leyenda: I. 25 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; II. 50 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; III. 100 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; IV. 50 % de las sales y vitaminas MS, 0,75 % de manitol; V. 50 % de las sales y vitaminas MS, 3,0 % de manitol.

El número de brotes mostró un comportamiento similar (tabla 4), apreciándose mayor formación de brotes en el tratamiento III (100 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol) con una media de 4,37 brotes por explante y sin diferencias entre los cultivares. Estos resultados no concuerdan con los alcanzados por Borges *et al.* (2009) y Carmona *et al.* (2013) quienes concluyen que el número de nudos no se ve afectado por el uso de diferentes fuentes de carbono en el medio de cultivo.

Tabla 4. Efecto de los tratamientos sobre el número de brotes a los 10 meses de conservados.

Tratamientos Cultivares	I	II	III	IV	V	$\bar{X}$
'Blanco o pelú'	2,75 b	2,50 b	5,50 a	4,60 ab	3,50 ab	3,65 a
'Ñame de caballo'	5,00 ab	3,50 ab	5,00 ab	3,50 ab	3,25 ab	4,05 a
'Cartagena'	3,50 ab	4,00 ab	4,00 ab	3,25 ab	2,50 b	3,45 a
'Búfalo de agua'	3,00 ab	3,25 a	3,00 a	3,50 a	3,25 a	3,20 a
$\bar{X}$	3,56 ab	3,31 b	4,37 a	3,56 ab	3,12 b	
EScultivares $\pm$ 0,21ns ESmedios $\pm$ 0,24* ESinteracción $\pm$ 0,49* CV = 27,7 %						

Leyenda: I. 25 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; II. 50 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; III. 100 % de las sales y vitaminas MS, 1,5 % de manitol; IV. 50 % de las sales y vitaminas MS, 0,75 % de manitol; V. 50 % de las sales y vitaminas MS, 3,0 % de manitol.

La presencia de la mayor concentración de manitol en el medio de cultivo favoreció estos resultados y se conoce que incrementa la supervivencia del material conservado durante el proceso de la recuperación en otros cultivos tales como malanga *Xanthosoma* (Rayas *et al.*, 2013) e *Ipomoea batatas* (Rayas *et al.* 2016 y 2019). Este efecto pudo ser favorecido también por la presencia de carbón activado en el medio de cultivo de conservación que contribuyó a la viabilidad del tejido en esta fase que a su vez permitía porcentaje más alto de recuperación del explante en estos tratamientos.

Esto demuestra la efectividad de estos compuestos para la conservación de *D. alata*. Sin embargo, Borges *et al.* (2009), indican que a medida que se aumenta la concentración de manitol en el medio de cultivo se incrementa de forma significativa el deterioro y necrosis del tejido foliar, lo cual se manifiesta de forma más diferencial al cabo de los 12 meses de conservación.

Resultados similares obtuvieron Carmona *et al.* (2013), al estudiar combinaciones de los osmolitos sacarosa, manitol y sorbitol para la conservación *in vitro* por crecimiento mínimo de segmentos uninodales de las especies *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida*, quienes concluyeron que estos osmorreguladores, y su combinación, permiten prolongar los periodos de subcultivo, y por ende la conservación efectiva de plantas *in vitro* a partir de segmentos uninodales de ñame, garantizando una tasa de crecimiento reducida del cultivo, así como un alto índice de supervivencia y viabilidad del material vegetal.

Sin embargo, Díaz *et al.* (2015) afirman que el uso de los diferentes agentes osmóticos afecta la supervivencia *in vitro* de la especie *D. alata*, por lo que no aconsejan el uso individual de manitol en el medio de cultivo de esta especie ya que ocasiona la muerte de todos los explantes y sugieren que se deba a una baja disponibilidad de nutrientes y de carbono, debido a la poca absorción de agua por parte de la planta por la reducción del potencial hídrico del medio de cultivo, producto de la adición de dicho osmorregulador. Este fenómeno ha sido observado también por Cárdenas y Villegas (2002), quienes encontraron que el uso de manitol como osmorregulador genera potenciales osmóticos más negativos en comparación al sorbitol.

Con el fin de evaluar las modificaciones anatómicas que se producen en plantas de ñame en tres condiciones de cultivo *in vitro*: plantas conservadas por métodos de mínimo crecimiento, plantas regeneradas y plantas en fase de multiplicación en el medio MS 75 %, Borges *et al.* (2016) realizaron un análisis de la anatomía foliar y caulinar a partir de cortes transversales de la lámina foliar y del tallo y observaron que las hojas de las plantas conservadas mostraron menor espesor del mesófilo y la epidermis y el área de los haces conductores del tallo también fue menor, debido al proceso de stress durante la conservación *in vitro*. Sin embargo, durante la recuperación del material conservado a través de la regeneración y la multiplicación *in vitro* se restablecieron de manera normal estos parámetros. Esto evidencia la factibilidad de la conservación *in vitro*.

El medio de cultivo recomendado se utilizó en la conservación *in vitro* del resto de los cultivares de la colección de *Dioscorea alata* con similares resultados.

CONCLUSIONES

1. Se determinó que en el medio de cultivo constituido por el 50 % de las sales y vitaminas de Murashige y Skoog, 3,0 % de manitol y 20 g de sacarosa se crean las condiciones de crecimiento mínimo.
2. Se logró la conservación de 50 cultivares de ñame en el medio de cultivo recomendado.

BIBLIOGRAFÍA

AIGHEWI, B.A.; R. ASIEDU; N. MAROYA and M. BALOGUN. 2015. Improved propagation methods to raise the productivity of yam (*Dioscorea rotundata* Poir.). *Food Security*, 7(4): 823-834.

- BALOGUN M.; N. MAROYA; J. AUGUSTO; A. AJAYI; L. KUMAR; B. AIGHEWI and R. ASIEDU. 2017. Relative Efficiency of Positive Selection and Tissue Culture for Generating Pathogen-free Planting Materials of Yam (*Dioscorea* spp.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 53(1): 9-16.
- BORGES, M.; Y. ALARCÓN; B. MALAURIE; Y. HERNANDEZ y J.J. SILVA. 2009. Conservación *in vitro* de *Dioscorea alata* L. cultivar Caraqueño. *Revista Peruana de Biología*, 16(2): 20-25.
- BORGES, M.; R. DESTRADE; S. MENESES; R. GÓMEZ; B. MALAURIE; P. HAMON y L.C. DEMENORVAL. 2011. Optimización de un medio de cultivo para plantas micropropagadas de *Dioscorea alata* L. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2): 221-228.
- BORGES, M.; R. GÓMEZ-KOSKY; E. ESTRADA; D. REYES; B. MALAURIE y R. DESTRADE. 2015. Respuesta en campo de plantas *in vitro* de *Dioscorea alata* L. cultivar 'Caraqueño' en distintos momentos de plantación. *Biotecnología Vegetal*, 15(3): 137-142.
- BORGES, M.; B. MALAURIE; S. MENESES; R. GÓMEZ; M. LARTAUD y J.C. VERDEIL. 2016. Anatomía comparada de plantas de *Dioscorea alata* L. cultivar Caraqueño cultivadas en tres ambientes de crecimiento *in vitro*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2): 112-118.
- CÁRDENAS, M. y A. VILLEGAS. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25: 213-217.
- CARMONA, O.E.; L.C. DÍAZ NARVÁEZ y J.D. BELTRÁN. 2013. Efecto de los osmolitos sacarosa, manitol y sorbitol en la conservación *in vitro* de *Dioscorea alata*, *D. bulbifera*, *D. rotundata* y *D. trifida* por el método de crecimiento mínimo. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 25: 41-51.
- CIAT. 2004. CIAT en perspectiva. 2003-2004. Cali, Colombia. 2004.
- DÍAZ NARVÁEZ, L.C.; O. E. CARMONA WILCHES y J. D. BELTRÁN HERRERA. 2015. Optimización de la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea* spp. por crecimiento mínimo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1): 32-39. doi: 10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50842.
- FAO. 2017. FAOSTAT. <http://www.fao.stat.org>. Consulta: enero, 2019.
- MINAG. 2018. Instructivo técnico del cultivo del ñame. Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT), Cuba, 12 p.
- MURASHIGE, T. and F. SKOOG. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3):473-497.
- PÉREZ D.; R. CAMPO y A. JARMA. 2015. Respuesta fisiológica del ñame espino (*Dioscorea Rotundata* Poir) a las densidades de siembra. *Revista Ciencias Agrícolas* 32(2):104 -112.
- RAYAS A.; M. CABRERA; A. SANTOS; M. BASAIL; J. LÓPEZ; Y. BEOVIDES y V. MEDERO. 2013. Efecto del manitol y el nitrato de plata en la conservación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma* spp.). *Revista Colombiana de Biotecnología* 15(1):167-171.
- RAYAS, A.; D. ARCE; A. SANTOS; M. BASAIL; J. LÓPEZ; V. MEDERO y M. BAUTA. 2016. Conservación *in vitro* de boniato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) cv. 'Cautillo'. *Agricultura Tropical* 2(1):41-51.

- RAYAS, A.; J. LÓPEZ; V.R. MEDERO; M. BASAIL; A. SANTOS y Y. GUTIÉRREZ. 2019. Conservación *in vitro* de cultivares de *Ipomoea batatas* (L.) Lam por crecimiento mínimo con el uso de manitol. *Biotecnología Vegetal*, 19(1): 43-51.
- ROCA, W. 1994. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y técnicas. CIAT, 63p.
- RODRÍGUEZ, D.; V. MEDERO; Y. BEOVIDES, y A. RAYAS. 2019. Efecto del momento de plantación de plantas producidas *in vitro* de ñame 'Blanco de Guinea', sobre la producción de minitubérculos. *Agricultura Tropical*, 5(1): 25-33.
- RODRÍGUEZ, S. 2000. Evaluación y recomendación de cultivares 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 de Ciencia y Técnica, Cuba. p. 67.
- SÁNCHEZ, L.A.; E.D. LABRADA y M. BORGES. 2019. Evaluación morfológica de plantas de ñame (*Dioscorea* spp.) procedentes de tubérculos sanos a los cuatro y siete meses de edad. *Revista Granmense de Desarrollo Local*, 3(1): 138-145.
- SCOTT, G.; M. ROSEGRANT and C. RINGLER. 2000. 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).