

Contenido de nutrientes minerales y metabolitos durante la multiplicación en biorreactores de *Dioscorea alata* (Original)


Content of mineral nutrients and metabolites during multiplication in bioreactors of *Dioscorea alata* (Original)

Afonso João Zambela. Ingeniero Agrónomo. Máster en Ciencias Agrícolas. Instituto Superior Politécnico “Dom Alexandre Cardeal Do Nascimento” ISPCAN –Malanje, Angola.

afonsojzambela@gmail.com 

Ángel Luis Espinosa Reyes. Licenciado en Educación en la especialidad de Química. Máster en Ciencias Agrícolas. Profesor Auxiliar. Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba.

aespinosar@udg.co.cu 

Jorge Liusvert Pérez Pérez. Ingeniero Agrónomo. Doctor en Ciencias Agrícolas. Profesor Titular. Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba. jperez@udg.co.cu 

Recibido: 28-10-2023/Aceptado: 27-12-2023

Resumen

Una alternativa para la propagación *in vitro* de plantas es el empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal; sin embargo, es limitada la información disponible sobre su uso en el cultivo del ñame, y no existen referencias en el clon Chino Blanco. El artículo tiene como objetivo determinar el contenido de nutrientes minerales y metabolitos presentes en el medio de cultivo de multiplicación de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco en Sistemas de Inmersión Temporal. Para determinar el contenido de nitrógeno total, calcio y magnesio, se tomaron muestras de medio de cultivo al inicio y al finalizar las seis semanas de cultivo. El contenido de nitrógeno total, se obtuvo por el método colorimétrico con el reactivo *Nessler* mientras que el calcio y magnesio

por el método volumétrico con Etilen-Diamino-Tetracético. Para corroborar la presencia de grupos de metabolitos se usaron controles negativos y positivos con medio de cultivo después de 28 días de cultivo. Se emplearon diferentes ensayos para la identificación de carbohidratos, alcaloides, fenoles, quinonas, catequinas, aminoácidos libres, flavonoides, triterpenos y esteroides. En el medio de cultivo disminuyó el contenido de nitrógeno total, mientras que se incrementó la concentración de calcio y magnesio; además se identificó la presencia de algunos metabolitos exudados al medio de cultivo como carbohidratos, catequinas, quinonas y fenoles.

Palabras clave: micropropagación; minerales; ñame; SETIS; Sistemas de Inmersión Temporal

Abstract

An alternative for the *in vitro* propagation of plants is the use of Temporary Immersion Systems; however, limited information is available on its use in cultivation of yam, and there are no references to the Chinese White clone. The objective of the article was to determine the content of mineral nutrients and metabolites present in the multiplication culture medium of *Dioscorea alata* clone Chino Blanco in Temporary Immersion Systems. To determine the content of total nitrogen, calcium and magnesium, samples of the culture medium were taken at the beginning and at the end of the six weeks of culture. The total nitrogen content will be reduced by the colorimetric method with the *Nessler* reagent, while calcium and magnesium will be reduced by the volumetric method with Ethylene-Diamine-Tetracetic. To corroborate the presence of groups of metabolites, negative and positive controls were used with culture medium after 28 days of culture. Different tests were used for the identification of carbohydrates, alkaloids, phenols, quinones, catechins, free amino acids, flavonoids, triterpens and steroids. In the culture medium, the total nitrogen content was exhausted, while the concentration of calcium and magnesium

increased; In addition, the presence of some metabolites exuded to the culture medium such as carbohydrates, catechins, quinones and phenols was identified.

Keywords: micropropagation; mineral; yam; SETIS; Temporary Immersion System

Introducción

De las más de 600 especies del género *Dioscorea*, *Dioscorea alata* L., es una de las más cultivadas en el mundo; sin embargo, existe poca disponibilidad de material vegetal de plantación, atribuido al empleo de los tubérculos en la alimentación y como material de plantación (Isekia & Matsumoto, 2020).

El cultivo *in vitro* permite la producción masiva de plantas libres de virus (Hesami et al., 2019). En este sentido, se han desarrollado diversos protocolos de multiplicación de brotes e inducción de microtubérculos en diferentes especies de ñame (Hussein et al., 2018), pero muchos de estos genotipos expresan bajos coeficientes de multiplicación (Balogun et al., 2017).

Una alternativa a la micropropagación en medio de cultivo semisólido, es el empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal; sin embargo, en la literatura científica es limitada la información existente sobre el uso de los Sistemas de Inmersión Temporal con el objetivo de multiplicación y/o microtuberización en el cultivo del ñame (Balogun et al., 2017).

Varios autores consideran que el análisis del contenido residual del medio de cultivo es una herramienta importante para determinar la influencia de los elementos minerales en la respuesta de diferentes especies al cultivo de tejidos (Adelberg et al., 2010). Por otro lado, en diferentes especies de ñame se han identificado compuestos bioactivos tales como fenoles, flavonoides, alantoína, dioscina, dioscorina, diosgenina, polifenoles, taninos, cianuro de hidrógeno, oxalato, saponina y alcaloides (Obidiegwu et al., 2020).

Por ello, el objetivo de la investigación fue determinar los nutrientes minerales y metabolitos exudados al medio de cultivo de multiplicación en Sistemas de Inmersión Temporal de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco.

Materiales y Métodos

La investigación se desarrolló en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal (CEBVEG), pertenecientes a la Universidad de Granma, Cuba.

Material vegetal y medio de cultivo

Se tomaron segmentos nodales con una yema axilar, a partir de plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco, en segundo subcultivo de multiplicación en medio de cultivo semisólido. Los brotes fueron seccionados bajo condiciones asépticas en cabina de flujo laminar, para su multiplicación en Sistemas de Inmersión Temporal SETIS™ (Figura 1), que contenían medio de cultivo con las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) 4,40 g.L⁻¹, cisteína 50 mg.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹, 6-bencilaminopurina (6-BAP) 0,5 mg.L⁻¹, ácido giberélico (AG₃) 1,0 mg.L⁻¹, pH 5,8 y se añadió Vitrofur® 116 mg.L⁻¹ para el control de los contaminantes microbianos.

Figura 1. Multiplicación de plantas *in vitro* de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco en Sistemas de Inmersión Temporal modelo SETIS™ a los 21 días de cultivo



Fuente: Elaboración propia.

Condiciones de cultivo

El cultivo se realizó en cámaras de crecimiento con luz solar indirecta, con una duración de fotoperíodo luminoso entre 11-12 horas, densidad del flujo de fotones fotosintéticos 60-70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, temperatura $26 \pm 2,0$ °C y humedad relativa entre 70 a 80 %. Los frascos fueron colocados bajo un diseño completamente al azar con empleo de tres Sistemas de Inmersión Temporal por tratamiento.

Determinación del contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo

El experimento se realizó con el objetivo de determinar el contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo durante la multiplicación de los brotes de ñame clon Chino Blanco en Sistema de Inmersión Temporal. El medio de cultivo contenía 0,5 mg.L^{-1} 6-BAP y un total de 30 explantes después de seis semanas de cultivo. Las muestras se tomaron al inicio y al final del subcultivo para determinar los contenidos de nitrógeno total (N), calcio (Ca) y magnesio (Mg).

El contenido de nitrógeno total, se determinó por el método colorimétrico con el reactivo *Nessler*. Después de preparada la dilución, se dejó en reposo durante 20-25 minutos para que se desarrolle el color amarillo-naranja. La intensidad del color se determinó en el fotocolorímetro, utilizando una longitud de onda de 440 nm en filtro azul. Con la lectura obtenida en el fotocolorímetro se determinó en el gráfico la concentración de nitrógeno y ese valor se utilizó para determinar la concentración de nitrógeno en la muestra (Paneque et al., 2010).

La determinación de calcio y magnesio se realizó por el método volumétrico con EDTA (Etilen-Diamino-Tetracético). El método está basado en la propiedad que tiene el calcio de reaccionar al EDTA a pH 9 y formar un complejo. El final de la reacción se determinó con el indicador negro T de Eriocromo. El calcio reacciona con el EDTA a pH=12 y el final de la

reacción se determinó con el indicador murexida (Paneque et al., 2010).

Se tomaron dos muestras con tres determinaciones para un total de seis determinaciones por repeticiones. Las lecturas de las muestras se realizaron en un espectrofotómetro Spekoll 11. Se tomaron muestras de 200 ml de medio de cultivo antes del autoclaveado, y a los 28 días al concluir el período de cultivo de las plantas *in vitro*. Las variaciones de pH, se determinaron con ayuda de un pHmetro marca Gripson.

Identificación de metabolitos exudados al medio de cultivo

Para corroborar la presencia de grupos de metabolitos se usaron controles positivos y negativos en cada ensayo. Para el experimento se tomó el medio de cultivo sin utilizar (control) y el medio de cultivo después de 28 días cultivo. La identificación de carbohidratos (ensayo de Molisch), alcaloides (ensayo de Wagner y ensayo de Dragendroff), fenoles (ensayo de cloruro férrico), quinonas (ensayo de Borntrager), catequinas, aminoácidos libres (ensayo de Nihidrina), flavonoides (ensayo de Shinoda), Triterpenos y/o esteroides (ensayo de Liebermann- Burchard), se realizó mediante los procedimientos descritos según Sahira y Cathrine (2015).

El contenido de polifenoles totales, se estimó por espectrofotometría UV/Visible (Jenway 6305), siguiendo la metodología de determinación colorimétrica de fenoles solubles en material vegetal, mediante el reactivo *Follin-Ciocalteu* (Panreac®) (Ainsworth & Gillespie, 2007) con modificaciones.

En un volumétrico de 25 ml se añadieron 5,0 ml de la muestra y 2,0 ml del reactivo de *Follin-Ciocalteu*. Se agitó y se dejó reposar por cinco minutos. Luego se añadió un mililitro de solución de carbonato de sodio al 20%, se agitó y se enrasó con agua destilada. Se dejó reposar durante una hora en condiciones de oscuridad. Luego se realizaron mediciones contra blanco de reactivos a 765 nm.

La concentración de fenoles totales fue calculada con la curva de calibración usando ácido gálico (0-16 ppm) como estándar (ecuación 1: $y=0,04651x + 0,0328$; $R^2 = 0,9964$). Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada litro de extracto. La medición de la absorbancia a 765 nm, se realizó en un espectrofotómetro UV-Vis marca Rayleigh UV-2100, China. Para calcular el contenido de fenoles en la muestra, se empleó la ecuación matemática: $X = (\bar{X} \text{ de Absorbancia} - 0,0328) / 0,04651$.

Análisis y discusión de los resultados

Contenido de nutrientes minerales en el medio de cultivo

Al finalizar la multiplicación de ñame en Sistemas de Inmersión Temporal, el nitrógeno fue el nutriente mineral con menor contenido en el medio de cultivo, el cual disminuyó en menos de un 5,0% de su valor inicial (Tabla 1). Por el contrario, los contenidos de calcio y magnesio, permanecieron por encima del valor inicial. La concentración de magnesio, se incrementó más de un 46,0 % por encima del contenido inicial; mientras que el calcio se mantuvo alrededor de su valor inicial, con un ligero aumento del 2,0%. En cuanto al valor del pH se constató una disminución que contribuyó a la acidificación del medio de cultivo, pero se mantuvo por encima del 50% de valor inicial.

Tabla 1. Contenido de nutrientes minerales y pH en el medio de cultivo al inicio y al finalizar la multiplicación de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco en el Sistema de Inmersión Temporal SETIS™ a los 28 días de cultivo

Nutrientes minerales	Medio de cultivo de multiplicación		
	Inicial (mg.L ⁻¹)	Final (mg.L ⁻¹)	Porcentaje respecto al valor inicial (%)
Magnesio	45,55	66,80	146,67
Calcio	145,28	148,28	102,06
Nitrógeno total	2,180	2,075	95,18
Potencial de hidrógeno			
pH	5,80	4,71	81,21

Fuente: Elaboración propia.

El aumento de la concentración de los minerales en la muestra final, está atribuido a que el volumen del líquido disminuye en el medio de cultivo y estos se concentran. Respecto a la concentración de calcio en la muestra inicial ($145,28 \text{ mg.L}^{-1}$), es mayor a lo que teóricamente ($119,95 \text{ mg.L}^{-1}$) debía contener el medio de cultivo MS, pero pudo estar atribuido a que siempre en el agua queda cierta cantidad de estos iones.

Durante el corto periodo evaluado, los explantes de ñame no absorbieron concentraciones significativas de calcio y magnesio, desde este punto de vista pudiera aprovecharse para prolongar el periodo de cultivo. Sin embargo, en este mismo periodo puede ocurrir el agotamiento de otros compuestos importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas como el fósforo, potasio, hierro, manganeso, zinc y cobre, por lo que cabría evaluar un mayor número de compuestos minerales en un prolongado periodo, durante el cual las plantas pasan por diferentes etapas de desarrollo que pudieran requerir un mayor consumo de los nutrientes minerales. Además, se realizaron subcultivos a medio de cultivo fresco a las cuatro semanas, debido a la pérdida de efectividad del Vitrofur® a partir de los 21 días de cultivo.

En cuanto a la acidificación del medio de cultivo pudo estar dada, por la frecuencia de inmersión, tiempo de inmersión y la concentración de macronutrientes. Al emplear 10 minutos de inmersión cada seis horas, existe un mayor contacto de los tejidos con el medio de cultivo líquido, estos absorben nutrientes y pudieran exudar otros compuestos que contribuyan a la acidificación del medio de cultivo.

No obstante, un estudio realizado por Skirvin et al. (1986), arrojó diferencias en el pH inicial y final del medio de cultivo después del autoclaveado, en dependencia de su estado físico y si estaba o no cultivado con material vegetal. No obstante, un pH 5,7 similar al del presente experimento, disminuyó a pH 4,6 después del autoclaveado en ambos medios de cultivo (líquido

y semisólido). También observaron que un pH 5,11 después de 48 horas sin cultivar bajaba a pH 4,99 y si tenía material vegetal disminuía a pH 4,55.

Agregan que el intercambio iónico, como una función del tipo nitrógeno en el medio de cultivo es una fuente probable de los iones de hidrógeno o hidróxido adicionales necesarios para explicar los cambios de pH. Los cambios de pH también podrían deberse en parte a la intrusión de iones H^+ en las paredes celulares para crear un pH óptimo para las enzimas que modifican la pared celular (Skirvin et al., 1986).

En la literatura científica se considera que las plantas que toman para el crecimiento, tanto los carbohidratos exógenos del medio de cultivo, como los carbohidratos producidos endógenos por la fotosíntesis, presentan una nutrición foto-mixotrófica (Kozai et al., 2005), proceso que pudo haber ocurrido en plantas de ñame clon Chino Blanco cultivadas en Sistema de Inmersión Temporal en condiciones de luz solar.

Los resultados obtenidos respecto al contenido final de nitrógeno, calcio y magnesio en el medio de cultivo, son superiores y difieren de los referidos por Cabrera et al. (2009) en ñame clon Pacala Duclos. Esta diferencia pudiera ser debido al corto periodo de cultivo utilizado en la presente investigación, en comparación con las 18 semanas que estos autores utilizaron de cultivo en Sistemas de Inmersión Temporal así como un mayor número de plantas por frasco de cultivo, lo que provocó un incremento en la biomasa vegetal y en consecuencia una mayor reducción de los nutrientes minerales presentes en el medio de cultivo.

En otros cultivos como el plátano FHIA-21 (*Musa* AAAB), en los primeros tres días de cultivo se incrementó el contenido de nutrientes minerales, con excepción del manganeso. El contenido de calcio se aumentó de manera continua hasta los seis días de cultivo. Posteriormente, se inició una disminución progresiva de todos los nutrientes minerales hasta los 30 días en que

finalizó el período de cultivo. No obstante, la evaluación realizada a los 18 días, reveló un aumento del contenido de nutrientes minerales, que pudo estar asociado a la renovación del 50% del medio de cultivo efectuado a los 15 días (García, 2011).

El incremento del contenido de los elementos minerales durante los primeros tres días de cultivo puede deberse a la liberación de componentes celulares por la lisis de algunas células (García, 2011). Entre las causas que ocasionan lisis celular se encuentra el estrés de las células o por el intercambio iónico que se produce durante los primeros días de cultivo, el cual ha sido observado principalmente con cationes como el calcio, potasio y el magnesio (George et al., 2008).

No obstante, estos elementos permiten relacionar las funciones en las células de las plantas, en las cuales se encuentran involucrados los nutrientes minerales de menor contenido en el medio de cultivo, con el crecimiento que experimentaron las plantas que se cultivaron en el Sistema de Inmersión Temporal.

Por ejemplo, un incremento en el contenido de nitrógeno en el medio de cultivo, pudiera estar relacionado con una mayor actividad fotosintética de las plantas, ya que este compuesto mineral según George et al. (2008), participa en las síntesis de moléculas orgánicas complejas, como aminoácidos, proteínas y la porfirina, molécula que se halla en las clorofilas y enzimas del grupo de los citocromos, esenciales para la fotosíntesis y respiración. Existen evidencias de la participación del magnesio en las moléculas de clorofila de los sistemas de pigmento I y II de la fotosíntesis.

Basado en esta información se considera que el agotamiento del nitrógeno es debido a que las plantas tenían un escaso desarrollo foliar, lo que pudo limitar la actividad fotosintética y por ende los tejidos suplieron las exigencias de este mineral mediante su absorción del medio de cultivo.

Respecto al contenido de calcio tuvo pocas variaciones y pudo haber jugado un rol importante durante la multiplicación del material vegetal en el Sistema de Inmersión Temporal, ya que en esta etapa de cultivo de alta actividad mitótica ocurrió la multiplicación y elongación celular, para inducir la formación de brotes a partir de las yemas contenidas en los segmentos nodales.

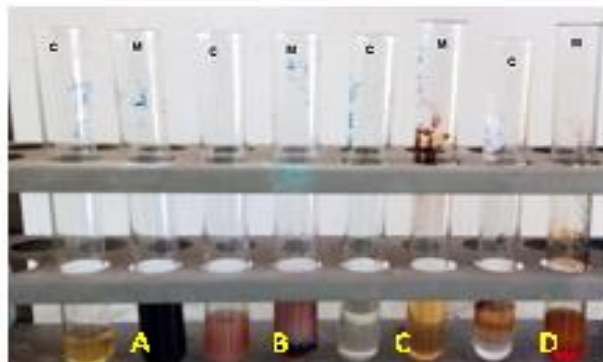
La literatura científica consultada plantea, que la acumulación de calcio en la pared celular y la membrana de la vacuola, incrementa la polaridad celular y estimula la diferenciación celular (García, 2011), pero si es utilizado en exceso puede reducir el potencial del explante para la formación de nuevos brotes, ya que endurece las paredes celulares al disminuir su flexibilidad (García et al., 2020).

Esto evidencia que los nutrientes minerales son los de mayor importancia porque intervienen en las funciones celulares y en el metabolismo de las plantas. Por esta razón constituyen la mejor variable para estudiar su efecto sobre la respuesta morfogénica de los tejidos vegetales (García et al., 2012).

Metabolitos exudados al medio de cultivo

Los resultados del tamizaje fitoquímico revelaron la presencia de metabolitos primarios (carbohidratos) y secundarios (fenoles, quinonas y catequinas) en la muestra de medio de cultivo analizada después de cuatro semanas de cultivo; por el contrario, estos compuestos no se observaron en los controles. La identificación de estos compuestos se corroboró mediante los cambios de coloración en las reacciones (Figura 2).

Figura 2. Identificación de metabolitos primarios y secundarios exudados al medio de cultivo de multiplicación de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco en Sistemas de Inmersión Temporal a los 28 días de cultivo. A) Fenoles, B) Carbohidratos, C) Catequinas y D) Quinonas



Leyenda: C – control; M – muestra

Fuente: Elaboración propia.

A continuación se muestra el resultado del tamizaje fitoquímico de los diferentes metabolitos identificados y cuantificados en la muestra. En ninguno de los casos su concentración fue abundante (Tabla 2), lo que está relacionado con la duración del tiempo de cultivo y el estado de desarrollo de las plantas.

Tabla 2. Resultados del tamizaje fitoquímico en la muestra del medio de cultivo líquido de multiplicación de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco en Sistemas de Inmersión Temporal SETIS™ a los 28 días de cultivo

Metabolitos	Medio de cultivo de multiplicación	
	Control (C)	Muestra (M)
Primarios:		
Carbohidratos	-	+
Aminoácidos libres	-	-
Secundarios:		
Fenoles	-	+
Flavonoides	-	-
Quinonas	-	+
Catequinas	-	+
Triterpenos y/o esteroides	-	-

Leyenda: (-) ausencia; (+) presencia; (++) abundante; (+++) muy abundante

Fuente: Elaboración propia.

En la literatura científica consultada es limitada la información disponible de estudios que aborden sobre los metabolitos primarios y secundarios exudados por las plantas *in vitro* al medio de cultivo líquido en el cultivo del ñame. Los resultados obtenidos son coherentes con estudios realizados en otras especies de la familia Dioscoreaceae, donde destacan la presencia de almidón,

proteínas, carbohidratos, vitaminas, minerales y fenoles, estos últimos responsables de una amplia gama de factores biológicos y actividades fisiológicas, en lo principal antioxidantes. Se ha documentado que existe una relación entre los niveles de actividad antioxidante y el contenido total de fenoles y flavonoides de los extractos de plantas (Soibam et al., 2017).

En este sentido, existen referencias que a partir de extractos obtenidos de hojas de *Dioscorea bulbifera*, se identificó la presencia de compuestos fenólicos, que sirven como antioxidantes o eliminadores de radicales libres. La acción de los eliminadores de radicales libres puede ser debido a la presencia de algunos flavonoides con un grupo hidroxilo libre capaz de donar hidrógeno y electrones (Murtala et al., 2021).

Sin embargo, en la presente investigación no se evidenció la presencia de flavonoides en el medio de cultivo, lo que pudo ser debido a su baja síntesis en la etapa de desarrollo en que se encontraban las plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco o al procedimiento utilizado para su identificación, ya que Murtala et al. (2021), realizaron la extracción de metabolitos secundarios a partir de hojas adultas con empleo de metanol, los cuales fueron identificados a través de tres ensayos diferentes al empleado en esta investigación.

Especies de *Dioscorea* han sido identificadas como una fuente posible de fenoles y ácido fenólicos. En *D. alata* se ha encontrado presencia de ácido ferúlico, sinápico, cafeico y p-cumárico y ácido vanílico. También existen referencias de componentes fenólicos en diez cultivares de ñame de cinco especies, destacando la prevalencia de estos compuestos en *D. alata* y *D. bulbifera* en comparación con las especies *D. cayenensis*, *D. dumetorum* y *D. rotundata* independientemente del cultivar (Obidiegwu et al., 2020).

Las catequinas se han identificado como el principal flavonoide, y se sospecha que contribuye al oscurecimiento del tejido y del medio de cultivo, ya que es un buen sustrato para la polifenol oxidasa y puede sufrir polimerización oxidativa para formar taninos (Lebot et al., 2018).

Por otro lado, se ha informado que los reguladores de crecimiento además de controlar el crecimiento fundamental y los procesos de desarrollo de las plantas, también regulan la producción de metabolitos secundarios de las plantas en el cultivo de tejidos vegetales. Sin embargo, las investigaciones que informan sobre el efecto de las topolinas en la producción de metabolitos secundarios son muy escasas a pesar de su potencial en el cultivo de tejidos (Amoo & Staden, 2013).

La influencia positiva de las citoquininas en la producción de fenoles podría estar relacionada con su papel indirecto a través de la represión de ciertos transportadores de macronutrientes, en las expresiones de genes asociados con la biosíntesis de metabolitos secundarios (Amoo & Staden, 2013).

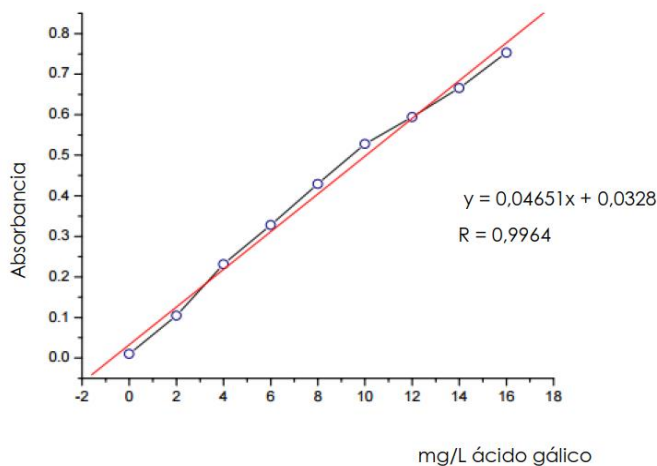
También se plantea que el contenido de fenoles está relacionado con el pH del medio de cultivo, siendo mayor a pH 5 y menor a pH 4. Además el contenido de fenoles totales en *Dioscorea alata* L. var *purpurea* es mayor que en otras especies debido posiblemente a la alta concentración de antocianinas, un pigmento que es relativamente inestable pero que su mayor estabilidad ocurre en medio ambiente ácido (Chen et al., 2008).

Estos compuestos intervienen en la activación de mecanismos de defensa frente a condiciones de estrés biótico y abiótico (Sharma et al., 2020) y, por lo tanto, median una relación entre las plantas y el medio ambiente, por tanto su expresión puede estar relacionado con las condiciones de estrés del material vegetal durante su cultivo en los Sistemas de Inmersión Temporal.

Para las cuantificaciones de fenoles se determinó la curva de calibración del ácido gálico obtenida para este ensayo (Figura 3). Los datos obtenidos indican una buena linealidad (0,9964),

lo que permitió hacer una buena cuantificación de fenoles totales en el medio de cultivo, utilizando como referencia a la curva de calibración del ácido gálico.

Figura 3. Curva de calibración del ácido gálico para cuantificación de fenoles totales



Fuente: Elaboración propia.

A continuación se muestran los resultados de las mediciones de la curva de calibración con empleo de un nivel de absorbancia de 765 nm (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de la medición de la absorbancia

Mediciones	Absorbancia (765 nm)
1	0,122
2	0,116
3	0,121
Promedio	0,119667
DS	0,003214
CV	2,6862

Fuente: Elaboración propia.

El resultado indica la presencia de compuestos fenólicos totales, el cual tuvo en un promedio de tres mediciones la cantidad de $1,8866 \text{ mg.L}^{-1}$, evidencia de la ocurrencia de actividad antioxidante, que causa el oscurecimiento del medio de cultivo.

Según Engelmann y Engelmann (2014), en un estudio con brotes de *Dioscorea trifida*, observaron que al emplear un medio de cultivo que combinaba $0,23 \mu\text{M AG}_3$ (ácido giberélico) con la metatopolina $25 \mu\text{M}$, provocaba una disminución en la longitud de los brotes en

comparación con los tratamientos que contenían brasinoesteroides 0,1 μM 24-Epibrasinolida o 25 μM zeatina riboside. Por el contrario, en las combinaciones de 0,6 μM 6-BAP con 1,07 μM ANA (ácido naftalenacético) y metatopolina 25 μM con 0,23 μM AG₃, se incrementó la oxidación del medio de cultivo.

En una investigación con la especie *Dioscorea birmanica*, se encontró que los brotes regenerados podían sintetizar y acumular metabolitos secundarios similar a la planta madre, aunque fue baja la cantidad de compuestos bioactivos en los brotes regenerados (Jirakiattikul et al., 2016).

Los metabolitos secundarios más comunes son las saponinas, y se han aislado más de 100 saponinas esteroides de varias especies de *Dioscorea*. Además se cuantificaron diterpenos, fenoles, cianidinas, quinonas, diarilheptanoides y compuestos nitrogenados de clerodano en tubérculos de la especie *Dioscorea nipponica* (Ou-Yang et al., 2018).

Conclusiones

1. Se determinó en el medio de cultivo un alto contenido de los nutrientes minerales calcio, magnesio y disminuyó el nitrógeno total, durante la multiplicación de los brotes de ñame clon Chino Blanco en Sistemas de Inmersión Temporal SETIS™.

2. Se identificó la presencia de carbohidratos, catequinas, quinonas y fenoles exudados al medio de cultivo de multiplicación de brotes de ñame clon Chino Blanco en Sistemas de Inmersión Temporal SETIS™.

Referencias bibliográficas

Adelberg, J., Delgado, M. & Tomkins, J. (2010). Spent medium analysis for liquid culture micropropagation of *Hemerocallis* on Murashige and Skoog medium. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 46, 95-107.

<https://doi.org/10.1007/s11627-009-9247-1>

- Ainsworth, E.A. & Gillespie, K.M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Follin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2, 875-877. <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.102>
- Amoo, S.O. & Staden, J. (2013). Influence of plant growth regulators on shoot proliferation and secondary metabolite production in micropropagated *Huernia hystrix*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 112, 249–256. <https://doi.org/article/10.1007/s11240-012-0230-x>
- Balogun, M., Maroya, N., Taiwo, J., Chukwunalu, O., Ajayi, A., Kumar, P.L., Pelemo, O., Aighewi, B. & Asiedu, R. (2017). *Clean breeder seed yam tuber production using temporary immersion bioreactors*. IITA. <https://www.semanticscholar.org/paper/Clean-breeder-seed-yam-tuber-production-using-Balogun-Maroya/a6585c8c2753cec406258116465be7867ec91673>
- 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), 19-30. <https://www.redalyc.org/pdf/776/77613172003.pdf>
- Chen, Y.T., Kao, W. T. & Lin, K. W. (2008). Effects of pH on the total phenolic compound, antioxidative ability and the stability of dioscorin of various yam cultivars. *Food Chemistry*, 107(1), 250-257. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.017>
- Engelmann, I. & Engelmann, F. (2014). Effect of various growth regulators on growth of yam (*Dioscorea trifida* L.) *in vitro* shoots tips. *African Journal of Biotechnology*, 13 (15), 1645-1649. <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/118719>

- García, D. A., Santos, M.S., Flores, J.P. & Osuna, P. (2020). Influencia del Ca²⁺, pH, agar y reguladores de crecimiento en la propagación *in vitro* de *Echinocactus parryi* (Engelm). *Terra Latinoamericana*, 38 (3), 489-498. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.734>
- García, L. (2011). *Embriogénesis somática del cv. Híbrido de plátano FHIA-21 (Musa AAAB) en medios de cultivo líquidos*. [Tesis de doctorado, Universidad de Santa Clara]. <https://repositorio.geotech.cu/xmlui/bitstream/handle/1234/3092/>
- García, L., Alvarado, Y., Kosky, R., Sarría, Z., Chong, B., Reyes, M., Pérez, B., Concepción, A. & Mollineda, A. (2012). Análisis del contenido de nutrientes minerales durante la formación y maduración de embriones somáticos de ‘FHIA-21’ (*Musa AAAB*). *Biotechnología Vegetal*, 12 (1), 33 - 40. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/141/html>
- George, E.F., Hall, M. A. & De Klerk, G.J. (2008). The components of plant tissue culture media I: Macro- and micro-nutrients. En: Hall, M. A. & De Klerk, G.J. (2008) (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer. pp. 65–113. https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-5005-3_3
- Hesami, M., Daneshvar, M. H. & Yoosefzadeh-Najafabadi, M. (2019). An efficient *in vitro* shoot regeneration through direct organogenesis from seedling derived petiole and leaf segments and acclimatization of *Ficus religiosa*. *Journal of Forestry Research*, 30 (3), 807–815. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0647-0>
- Hussein, I., Mengs, B. & Matiwas, T. (2018). Effect of plant growth regulators on *in vitro* propagation of yam Landraces (*Dioscorea* Species) using nodal segments. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 8 (21), 13-23. <https://core.ac.uk/download/pdf/234662712.pdf>

- Isekia, K. & Matsumoto, R. (2020). Effect of seed sett size on sprouting, shoot growth, and tuber yield of white guinea yam (*Dioscorea rotundata*). *Plant Production Science*, 23 (1), 75–80. <https://doi.org/10.1080/1343943X.2019.1667835>
- Jirakiattikul, Y., Rithichai, P., Songsri, O., Ruangnoo, S. & Itharat, A. (2016). *In vitro* propagation and bioactive compound accumulation in regenerated shoots of *Dioscorea birmanica* Prain & Burkill. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 249. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-016-2268-6>
- Kozai, T., Afreen, F. & Zobayed, S.M.A. (2005). *Photoautotrophic (sugar-free medium) micropropagation as a new micropropagation and transplant production system*. Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/1-4020-3126-2>
- Lebot, V., Malapa, R., Abraham, K., Molisalé, T., Van Kien, N., Gueye, B. & Waki, J. (2018). Secondary metabolites content may clarify the traditional selection process of the greater yam cultivars (*Dioscorea alata* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 65, 1699–1709. <https://doi.org/10.1007/s10722-018-0647-0>
- Murtala, M., Abu, M.F., Md, A., Linatoc, A.C., Abu, F.I., & Ranneh, Y. (2021). Secondary metabolites, antioxidant, and antiproliferative activities of *Dioscorea bulbifera* leaf collected from Endau Rompin, Johor, Malaysia. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. <https://doi.org/10.1155/2021/8826986>
- Obidiegwu, J.E., Lyons, J. B. & Chilaka, C.A. (2020). The *Dioscorea* genus (Yam)—An appraisal of nutritional and therapeutic potentials. *Foods*, 9 (9), 1304. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7555206>

- Ou-Yang, S.H., Jiang, T., Zhu, L. & Yi, T. (2018). *Dioscorea nipponica* Makino: a systematic review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profiles. *Chemistry Central Journal*, 12 (1), 57. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29748731/>
- Paneque, V.M., Calaña, J., Calderón, M., Borges, Y., Hernández, T. & Caruncho, M. (2010). *Manual de técnicas analíticas para análisis de suelo, foliar, abonos orgánicos y fertilizantes químicos*. Ediciones INCA. <https://www.semanticscholar.org/paper/Manual-de-t%C3%A9cnicas-anal%C3%ADticas-para-an%C3%A1lisis-de-y-Paneque-P%C3%A9rez/a0255840ec7a05b9386483908176c71b884f573c>
- Sahira, K. & Cathrine, L. (2015). General techniques involved in phytochemical analysis. *International Journal of Advanced Research in Chemical Science*, 2 (4), 25-32. <https://www.arcjournals.org/pdfs/ijarcs/v2-i4/5.pdf>
- Sharma, S., Sharma, S., Kukreja, S., Jadon, V. & Sharm, V. (2020). Plant tissue culture methods in secondary metabolite production – a mini review. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 21(43 & 44), 144-153. <https://www.ikpress.org/index.php/PCBMB/article/view/5487>
- Skirvin, R. M., Chu, M.C., Mann, M.L., Young, H., Sullivan J. & Fermanian, T. (1986). Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, 5 (4), 292-294. <https://doi.org/10.1007/BF00269825>
- Soibam, H., Singh, V. & Mitra, S. (2017). Evaluation of percent antioxidant and related secondary metabolite compositions of *Dioscorea alata* and *D. rotundata* cultivars. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science*, 6(9), 121-125. <https://bepls.com/beplsAugust2017/21.pdf>