

EMPLEO DEL SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL PARA LA MULTIPLICACIÓN *IN VITRO* DEL CULTIVAR DE BONIATO 'INIVIT BS 16-2006'

Milagros Basail Pérez*, Víctor Medero Vega, Arletys Santos Pino, Marlenys Torres Delgado, Eneida Otero Gálvez, Jorge López Torres, Aymé Rayas Cabrera, Yoel Beovides García.

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

*Autor para la correspondencia: sit.biotec@inivit.cu

RESUMEN

El trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) con el objetivo de incrementar el coeficiente de multiplicación en el cultivar de boniato 'INIVIT BS 16-2006'. Se estudiaron diferentes tiempos y frecuencias de inmersión de los explantes en frascos de cultivo de 500 ml de capacidad, volumen de medio de cultivo por explante, así como el momento de subcultivo en el Sistema de Inmersión Temporal. Se evaluó la longitud del explante (cm), número de entrenudos por explante, número de hojas activas, coeficiente de multiplicación, peso promedio (g). Los mejores resultados se alcanzaron al utilizar un tiempo y una frecuencia de inmersión de 10 minutos cada tres horas. Cuando se evaluó el efecto del volumen de medio de cultivo y el momento de subcultivo el mejor resultado se logró al utilizar 15 ml por explante con 30 días de cultivo incrementándose de esta forma el coeficiente de multiplicación de 1: 2,23 to 1:8,31.

Palabras clave: Coeficiente de multiplicación, frascos de cultivo, frecuencia de inmersión, volumen de medio de cultivo.

USE OF THE TEMPORARY IMMERSION SYSTEM FOR THE *IN VITRO* MULTIPLICATION OF BONIATO CULTIVATE 'INIVIT BS 16-2006'

ABSTRACT

This work was carried out at the Plant Biotechnology Laboratory from the Research Institute of Tropical Root and Tuber Crops (INIVIT) in order to increase the multiplication coefficient of the sweet potato cultivar 'INIVIT BS 16-2006'. Different immersion times and immersion frequencies of explants in 500-ml culture flasks were studied, as well as, culture medium volume per explant and subculture time in the temporary immersion system. Explant length (cm), internode number per explant, active leaf number, multiplication coefficient, and average weight (g) were evaluated. Best results were achieved using a 10-minute immersion frequency every three hours. When the effect of culture medium volume and subculture times was evaluated, the best response was obtained with 15 ml per explant and a cultivation time of 30 days, and so, the multiplication coefficient increased like this 1: 2,23 a 1: 8,31.

Keywords: Coefficient of multiplication, culture flasks, immersion frequency, volume of culture medium.

INTRODUCCIÓN

Las raíces tropicales se han convertido en cultivos de gran demanda nacional e internacional, debido a su importancia estratégica a nivel nacional para la alimentación humana, animal y otros fines industriales; lo que ha implicado el aumento de las áreas de producción y las perspectivas de trabajos relacionadas con la obtención de "semilla" de alta calidad y el mejoramiento genético de estos cultivos.

En los últimos tiempos se han desarrollado investigaciones sobre la automatización en la propagación de plantas, que incluyen el diseño de nuevos sistemas para la micropropagación, ya que reducen el costo por explantes, permiten una mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación que se obtienen y un mejor comportamiento de las vitroplantas *ex vitro* por mayor metabolismo autotrófico durante la fase *in vitro* (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

Los sistemas de inmersión temporal (SIT) además de solucionar las dificultades de los cultivos en medios líquidos estáticos, abren la posibilidad de semiautomatizar algunas etapas del cultivo *in vitro* (Alvard *et al.*, 1993), permiten mayor facilidad de escalado y aumentan la eficiencia biológica y productiva del material propagado (Castro, 2001).

De esta forma, el cultivo en inmersión temporal puede constituir una vía alternativa de micropropagación a corto plazo, mientras, a largo plazo se venzan obstáculos biológicos que permitan la obtención eficiente de plantas y embriones somáticos en biorreactores (Escalona *et al.*, 1999). El siguiente trabajo tiene como objetivo aumentar el coeficiente de multiplicación en el Sistema de Inmersión Temporal para el cultivar de boniato 'INIVIT BS 16-2006'.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT) donde se realizaron diferentes experimentos. Se emplearon baterías formadas por dos frascos de cultivo de 500 ml de capacidad, uno para el crecimiento de los explantes y el otro como reservorio de medio de cultivo (Escalona, 1999).

Procedimientos generales de la Investigación

Material vegetal

Se utilizó el cultivar de boniato 'INIVIT BS 16-2006', procedente del banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT).

Instrumental

La cristalería y otros accesorios que se emplearon en la manipulación del material vegetal se esterilizaron en una estufa (SUTJESKA) a 180 °C durante dos horas. El instrumental utilizado (bisturís y pinzas) se desinfectaron en un esterilizador eléctrico modelo (DENT-EQ) que permaneció dentro de la cabina de flujo laminar horizontal (FLUFRANCE), donde se realizaron las operaciones de manejo del material vegetal y el montaje de los sistemas de cultivo.

Efecto del tiempo de inmersión

Para la determinación del tiempo de inmersión se estudiaron tres tiempos (5, 10 y 15 minutos), con una frecuencia cada 6 horas. Se empleó el medio de cultivo basal propuesto por Murashige y Skoog (1962), MS suplementado con 2,0 mg.l⁻¹ de Tiamina + 0,1 mg.l⁻¹ de mioinositol + 50,0 mg.l⁻¹ de sacarosa.

Efecto de la frecuencia de inmersión

Cuando se estudió la frecuencia de inmersión se utilizó el mejor tiempo de inmersión obtenido anteriormente, así como el medio de cultivo y se varió la frecuencia de inmersión (cada tres, seis y ocho horas). En ambos experimentos se utilizaron 10 explantes por tratamiento en frascos de 500 ml de capacidad y el volumen medio de cultivo a utilizar fue de 20 ml por explante.

Efecto del volumen de medio de cultivo en el Sistema de Inmersión Temporal

Para estudiar el efecto del volumen de medio de cultivo por explante se utilizaron cuatro tratamientos (10, 15, 20 y 25 ml por explante). Se adicionaron a cada frasco de cultivo 10 explantes en fase de multiplicación. Las evaluaciones realizadas se llevaron a cabo a los 25 días de cultivo.

Efecto del momento de subcultivo en el Sistema de Inmersión Temporal

Para la determinación del momento de subcultivo en el Sistema de Inmersión Temporal se concibieron cuatro tratamientos: 20; 25; 30 y 35 días de cultivo y se utilizó el mejor volumen de medio de cultivo por explante (cantidad de nutrientes) obtenido anteriormente. En ambos experimentos se utilizó un tiempo de inmersión de diez minutos a una frecuencia cada tres horas (ocho inmersiones por día), donde se evaluaron las siguientes variables: longitud del explante (cm), número de entrenudos por explante, número de hojas activas y coeficiente de multiplicación. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

El coeficiente de multiplicación (CM) se calculó de la siguiente forma:

$$CM = \frac{\text{Número de explantes obtenidos en el frasco de cultivo}}{\text{Número de explantes adicionados al frasco de cultivo}}$$

Todos los tratamientos fueron incubados a 27 ± 2 °C de temperatura con una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) de $62\text{-}68 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y fotoperíodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad.

Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar. En el procesamiento estadístico de los datos se utilizó el *software* SPSS versión 15.0. Se comprobó el ajuste a la distribución normal de los datos de cada tratamiento (Kolmogorov-Smirnov) y la homogeneidad a las varianzas (Levene). Los datos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple y la comparación múltiple de medias se realizó según Tukey con un nivel de significación de $p < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tiempo de inmersión

Al aplicar un tiempo de inmersión de 10 minutos con una frecuencia de inmersión cada seis horas (Tabla 1) se obtienen los mejores resultados en todas las evaluaciones realizadas para la longitud del explante (cm), número de entrenudos por explante, número de hojas activas, coeficiente de multiplicación y peso promedio con diferencias significativas respecto al resto.

El tiempo de inmersión es considerado un factor importante en la respuesta morfogénica del material vegetal a micropropagar. Al respecto, Escalona (1999) para el cultivo de la piña encontró que con un tiempo de inmersión de dos minutos por hora con una frecuencia de tres horas se lograron los mayores incrementos en el coeficiente

de multiplicación y por lo tanto se facilitó una mayor eficiencia en la asimilación de nutrientes por los explantes.

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión sobre las variables evaluadas en el cultivar de boniato 'INIVIT BS 16-2006'.

Tratamientos	Longitud explante (cm)	No. Entrenudos por explante	No. Hojas Activas	Coef. Multip.	Peso promedio (g)
5 minutos	3,86 c	2,87 c	2,37 b	3,67 c	0,19 b
10 minutos	7,61 a	6,28 a	4,65 a	7,54 a	0,42 a
15 minutos	5,35 b	4,86 b	2,14 b	5,99 b	0,23 b
ES $\pm$	0,54 *	0,35*	0,27 *	0,17*	0,16*
CV (%)	12,20	13,87	11,89	14,56	12,65

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Roels *et al.* (2005) cuando incrementaron el tiempo de inmersión a 12 minutos, lograron lo mejores resultados en la multiplicación y en las características morfológicas de los brotes de plátano 'CEMSA 3/4' (AAB), no siendo así con un tiempo de 22 minutos, donde los brotes presentaron hiperhidricidad, inferior desarrollo en longitud y menor número de hojas.

Santos (2008) en el cultivar de malanga 'Viequera' (*Xanthosoma spp.*) demostró que el tiempo de inmersión de 14 minutos favoreció el coeficiente de multiplicación de los brotes de yemas axilares debido a que propició mayor disponibilidad de nutrientes a los mismos en comparación con un tiempo de inmersión de siete minutos.

Basail *et al.* (2015) demostraron que con inmersiones cada tres horas durante 10 minutos obtuvieron los máximos valores para el coeficiente de multiplicación de 1: 8,93 en el cultivar de plátano vianda 'CEMSA 3/4'.

Efecto de la frecuencia de inmersión

Al utilizar una frecuencia de inmersión cada tres horas (ocho inmersiones por día) y 10 minutos de inmersión se obtienen los valores máximos para las variables evaluadas, con diferencias significativas respecto al resto de los demás tratamientos sin la presencia de brotes hiperhidratados (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de la frecuencia de inmersión en la multiplicación del cultivar de boniato 'INIVIT BS 16-2006' a los 30 días de cultivo.

Tratamientos	Longitud explante (cm)	No. Entrenudos por explante	No. Hojas Activas	Coef. Multip	Peso promedio (g)
tres horas	7,61 a	5,79 a	4,99 a	8,18 a	0,44 a
seis horas	3,86 b	3,17 b	3,55 b	5,12 b	0,29 b
ocho horas	2,54 c	1,99 c	1,75 c	3,16 c	0,14 c
ES $\pm$	0,25 *	0,31*	0,32 *	0,28*	0,12*
CV (%)	9,17	10,23	13,56	13,05	11,20

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Cabrera *et al.* (2005) emplearon un tiempo de inmersión de 10 minutos y una frecuencia de seis horas y obtuvieron un elevado número de microtubérculos de ñame (4,7) en el cultivar Pacala Duclos en frascos de inmersión temporal de cinco litros.

Sin embargo, Basail *et al.* (2012) en el cultivar de plátano 'INIVIT PV 06 – 30' (AAB), obtuvieron el mejor coeficiente de multiplicación (10,90) con inmersiones cada seis horas.

Los altos coeficientes de multiplicación pueden estar dados porque los tiempos de inmersión son cortos, por lo tanto, los explantes están recubiertos de una película de medio de cultivo líquido y de esta forma se evita la desecación de los mismos. La resistencia a la difusión de gases es baja y existe una mínima ruptura de intercambio gaseoso entre los tejidos y la atmósfera interna del frasco de cultivo, por tal razón esta se renueva en intervalos regulares de tiempo (Cabrera, 2009).

Igarza *et al.* (2011) obtuvieron microtubérculos de papa de la variedad 'Andinita' en Sistema de Inmersión Temporal con inmersiones cada cuatro horas, con un promedio entre cinco y siete microtubérculos por planta (aproximadamente 600 microtubérculos por recipiente de cultivo).

Los tiempos y frecuencias de inmersión que se ensayaron según las posibilidades de automatización, demostraron que, con diez minutos de inmersión y tres horas empleados en los experimentos se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a la producción y calidad de los explantes.

Efecto del volumen de medio de cultivo en el Sistema de Inmersión Temporal

El volumen de medio de cultivo tuvo influencia en el coeficiente de multiplicación con la adición de 10 explantes por frasco de cultivo de 500 ml de volumen total. El mayor valor se alcanzó cuando se empleó una relación de 15 ml de medio de cultivo (8,01) por explante con diferencias significativas con el resto de los demás tratamientos (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del volumen de medio de cultivo sobre las variables evaluadas en el cultivar de boniato 'INIVIT BS 16-2006'.

Tratamientos	Longitud explante (cm)	No. Entrenudos por explante	No. Hojas Activas	Coef. Multip	Peso promedio (g)
10 ml por exp.	3,58 c	3,17 c	3,85 c	5,58 d	0,15 b
15 ml por exp.	6,75 a	5,75 a	4,98 a	8,01 a	0,41 a
20 ml por exp.	4,99 b	3,95 b	2,94 b	5,51 b	0,26 b
25 ml por exp.	3,96 c	3,59 b	1,78 d	5,54 b	0,18 b
ES ±	0,28 *	0,16*	0,19 *	0,25*	0,16*
CV (%)	11,82	12,84	11,14	10,23	12,25

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Ziv (2005) al utilizar 62,5 ml por explante en biorreactores de 2500 ml de volumen total obtuvo un elevado coeficiente de multiplicación (1:15,10) con la adición de 20 explantes en bananos 'Gran Enano'.

Según Castro y González (2002) para lograr un desarrollo en las técnicas de cultivo de tejidos es necesario proveer a las plantas con suficientes cantidades de nutrientes esenciales (incluyendo la sacarosa y carbono como fuentes de energía bajo

condiciones heterotróficas), de tal manera que los nutrientes no sean un factor limitante para la multiplicación en el desarrollo de las plantas. De acuerdo con los resultados obtenidos en *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden demostraron que con el empleo de un volumen de 500 ml de medio de cultivo con 9 explantes se logró un elevado coeficiente de multiplicación de 1:10,5 brotes y la mejor calidad de los brotes en términos de una mayor producción de masa seca.

Santos *et al.* (2011) al utilizar un volumen de medio de cultivo de 15 ml por brote de yema axilar en el cultivar de malanga 'Viequera' obtuvo los mejores resultados en la fase de multiplicación en cuanto al coeficiente de multiplicación 1:10,50.

Basail *et al.* (2013) demostraron que para el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB), con un volumen de medio de cultivo de 60 ml por explante, en frascos de Sistema de Inmersión Temporal incrementó el coeficiente de multiplicación a 1:7,58 por cada explante inoculado.

Efecto del momento de subcultivo en el Sistema de Inmersión Temporal

Se comprobó que el mayor valor en cuanto a las variables evaluadas se alcanzó a partir de los 30 días de realizado el subcultivo (Tabla 4), siendo éste superior, pero sin diferencias significativas con el tratamiento de 35 días de cultivo, pero sí con los demás tratamientos (20 y 25 días de cultivo). Por lo tanto, el tiempo de subcultivos es a partir de los 30 días, pues a través de este período de multiplicación se puede obtener una mayor cantidad de explantes.

Tabla 4. Efecto del momento de subcultivo en el cultivar de boniato 'INIVIT BS 16-2006'.

Tratamientos	Longitud explante (cm)	No. Entrenudos por explante	No. Hojas Activas	Coef. Multip	Peso promedio (g)
20 días	4,99 c	2,56 c	3,12 c	4,25 c	0,23 c
25 días	5,92 b	3,12 b	3,95 b	5,63 b	0,29 b
30 días	8,56 a	6,25 a	5,01 a	8,31 a	0,42 a
35 días	8,25 a	6,01 a	5,06 a	8,25 a	0,39 a
ES ±	0,37 *	0,31*	0,29 *	0,33*	0,27*
CV (%)	12,45	11,58	10,25	12,69	9,56

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para $p < 0,05$ según prueba de Tukey.

Basail *et al.* (2008) obtuvo resultados muy similares en la multiplicación del cultivar de boniato 'INIVIT B2-2005' en el Sistema de Inmersión Temporal con frascos de 200 ml de capacidad incrementando el coeficiente de multiplicación de 1:4,56 a 1:8,01 con un tiempo de subcultivos de 30 días.

Williams (1995) demostró que hay diversos cultivares de boniato (*Ipomoea batatas*, Lam) que con pocos períodos de tiempo en el Sistema de Inmersión Temporal comienzan un incremento en cuanto al coeficiente de multiplicación, alcanzando el número y calidad de los brotes deseados.

Escalona *et al.* (1999) para el cultivo de la piña demostraron que períodos prolongados promovieron la deformación de los brotes y por lo tanto afectaron el número de brotes que se podía obtener.

De forma general los experimentos desarrollados permitieron incrementar de forma significativa el coeficiente de multiplicación en el cultivar de boniato 'INIVIT BS 16-2006' en Sistema de Inmersión Temporal con un tiempo y frecuencia de inmersión de 10 minutos cada tres horas con un volumen de medio de cultivo por explante de 15 ml a los 30 días de cultivo. (Figura 1).



Figura 1. Resultados de la propagación *in vitro* del cultivar de boniato 'INIVIT BS 16-2006' en el Sistema de Inmersión Temporal a los 30 días de cultivo en frasco de 500 ml de capacidad.

CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados en el trabajo permitieron demostrar que es posible multiplicar el cultivar de boniato 'INIVIT BS 16-2006' en Sistema de Inmersión Temporal con el empleo de un tiempo de inmersión de 10 minutos a una frecuencia cada tres horas (ocho inmersiones por día) con un volumen de medio de cultivo de 15 ml por explante a los 30 días de cultivo, lo que garantizó la mejor respuesta de los explantes en cuanto al coeficiente de multiplicación (1:8,31).

BIBLIOGRAFÍAS

- AITKEN-CHRISTIE, J; H. E DAVIES; C. KUBOTA and T. KOSAI. 1995. Automation in Plant Tissue Culture. General introduction overview: Automation and environment control in Plant Tissue Culture Kluwer, Academic Publisher, Dordrech, p.1-19.
- ALVARD, D.; F. COTE and C. TEISSON. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 32 (1): 55-60.
- BASAIL, M; V. MEDERO; M. CABRERA; A. SANTOS; M. TORRES; E. OTERO; A. ORTEGA; J. LÓPEZ; A. RAYAS; Y. BEOVIDES y E. PAZ. 2008. Multiplicación de *Ipomoea batatas* clon 'INIVIT B2-2005' en Sistema de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 8(2): 103-106.
- BASAIL, M; V. MEDEROS; E. OTERO; M. TORRES; J. LÓPEZ; M. CABRERA; A. SANTOS; A. RAYAS; M. BAUTA y Y. BEOVIDES. 2012. Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVIT PV-0630' (*Musa* spp., AAB). *Biotec. Vegetal*, 12(1):53-57.

- BASAIL, M.; V. MEDEROS; E. OTERO; M. TORRES; J. LÓPEZ; M. CABRERA; A. SANTOS; A. RAYAS; M. BAUTA y Y. BEOVIDES. 2013. Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV-2011' (AAB). *Revista Colombiana de Biotecnología Vegetal*, 15(1):98-107.
- BASAIL, M.; V. MEDEROS; Y. TORRES; A. ROBAINA; J. LÓPEZ; A. SANTOS; A. RAYAS; M. BAUTA; Y. BEOVIDES y Y. GUTIÉRREZ. 2015. Multiplicación del clon de plátano vianda 'CEMSA ¾' (AAB) en Sistema de Inmersión Temporal. *Revista Agricultura Tropical*, 1(2):32-41.
- CABRERA, M. 2009. Formación de microtubérculos de ñame (*Dioscorea alata* L.) clon 'Pacala Ducloc' en Sistema de Inmersión Temporal como material vegetal de plantación. Tesis para aspirar al Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Santa Clara, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba.
- CABRERA, M.; R. GÓMEZ; M. BASAIL; A. SANTOS; V. MEDEROS; J. LÓPEZ; A. RAYAS; M. GARCÍA and J. VENTURA. 2005. Production of yam microtubers using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83(1): 103-107.
- CASTRO, D and J. GONZÁLEZ. 2002. *Eucalyptus* (*Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden) micropropagation in a temporary immersion system. *Agricultura sostenible*, 62(1): 68-78. Colombia.
- CASTRO, D. 2001. Propagación mixotrófica de *Eucalipto grandis* Hill ex Maide en biorreactores de inmersión temporal. Tesis para optar por el Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Univ. de Ciego de Ávila, Centro de Bioplasmas. Cuba.
- ESCALONA, M. 1999. Propagación de la piña (*Ananas comosus* (L.) Merr.) en sistemas de inmersión temporal. Tesis para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Ciego de Ávila, Centro de Bioplasmas, Cuba. 102 p.
- ESCALONA, M.; J.C. LORENZO; B. GONZÁLEZ; M. DAQUINTA; J.L. GONZÁLEZ; Y. DEJARDINS and C. BORROTO. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* (L) Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9):723-748.
- IGARZA, J.; D. AGRAMANTE; M. DE FERIA; J. RODRÍGUEZ; M. PÉREZ y M. ROMÁN. 2011. Obtención de microtubérculos de papa cv. 'Andinita' en sistemas de inmersión temporal. *Biotecnología Vegetal*, 11 (1): 59 -62.
- MURASHIGE, T and SKOOG. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, p. 473-497.
- ROELS, S.; C. NOCEDA; M. ESCALONA; J. SANDOVAL; M. CANAL; R. RODRÍGUEZ and DEBERGH. P. 2005. Optimization of plantain (*Musa* AAB) micropropagation by Temporary Immersion System. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 82 (2): 57-66.
- SANTOS, A. 2008. Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga 'Viequera' (*Xanthosoma* spp.). Tesis presentada en opción al Título Académico de Magister Scientiae en Biotecnología Vegetal. p.1-61.
- SANTOS, A.; M. CABRERA; R. GÓMEZ; J. LÓPEZ; A. RAYAS; M. BASAIL; V. MEDERO y Y. BEOVIDES. 2011. Multiplicación en sistema de inmersión temporal del clon de malanga 'Viequera' (*Xanthosoma* spp.) *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2): 97-106.
- WILLIAMS, R. 1995. The chemical microenvironment. In: Aitken-Christie., T. Kozait., M. Smith, A. L. (Eds). *Automation and Environmental control in Plant Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers, p. 405- 438.
- ZIV, M. 2005. Simple bioreactor for mass propagation of plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81 (2): 277-285.