

Multiplicación de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco en sistemas de inmersión temporal**(Original)****Multiplication of *Dioscorea alata* clone Chino Blanco in temporary immersion systems****(Original)**

Afonso João Zambela. Ingeniero Agrónomo. Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba.

afonsozambela@gmail.com 

Jorge Liusvert Pérez Pérez. Ingeniero Agrónomo. Doctor en Ciencias Agrícolas. Profesor

Titular. Universidad de Granma. Bayamo. Granma. Cuba. jperez@udg.co.cu 

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 

Recibido: 15-03-2022/ Aceptado: 06-06-2022

Resumen

El ñame es un cultivo de alto valor nutricional para la población, pero la insuficiente disponibilidad de material de plantación limita su cultivo a gran escala. Mediante el uso de herramientas biotecnológicas es posible su propagación, aunque existen pocos trabajos que emplean los Sistemas de Inmersión Temporal. El trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes tiempos y frecuencias de inmersión temporal, en la multiplicación de segmentos nodales en *Dioscorea alata* clon Chino Blanco. Primeramente se evaluaron tres tiempos de inmersión (5,0; 10,0 y 15,0 minutos) con una frecuencia cada ocho horas. Luego se fijó el mejor tiempo y se evaluaron las respuestas con frecuencias de inmersión cada 4, 6 y 8 horas por día. A los 21 días de cultivo se evaluó el color de los brotes, número de brotes, la longitud de los brotes y el coeficiente de multiplicación. En resumen, se logró la multiplicación de los segmentos nodales

del ñame clon Chino Blanco, con diferencias significativas entre los tratamientos empleados en los sistemas de inmersión temporal SETIS™. Con el empleo de diez minutos de inmersión cada seis horas se obtuvo el mayor número de segmentos nodales (3,85), se incrementó la longitud promedio de los brotes (1,68 cm) y no se evidenciaron síntomas de hiperhidricidad durante los 21 días de cultivo.

Palabras clave: biorreactores; cultivo de tejido; micropropagación; ñame

Abstract

Yam is a crop of high nutritional value for the population, but the insufficient availability of planting material limits its cultivation on a large scale. Through the use of biotechnological tools, its propagation is possible, although there are few works that use Temporary Immersion Systems. The objective of the work was to evaluate the effect of different times and frequencies of temporal immersion, on the multiplication of nodal segments in *Dioscorea alata* clone Chino Blanco. First, three immersion times (5.0, 10.0 and 15.0 minutes) were evaluated with a frequency of every eight hours. Then the best time was set and the response was evaluated with immersion frequencies every 4, 6 and 8 hours per day. At 21 days of cultivation, the color of the shoots, the number of shoots, the length of the shoots and the multiplication coefficient were evaluated. In summary, the multiplication of the nodal segments of the Chino Blanco clone yam was achieved, with significant differences between the treatments used in the SETIS™ temporary immersion systems. With the use of ten minutes of immersion every six hours, the highest number of nodal segments was obtained (3.85), the average length of the shoots increased (1.68 cm) and no symptoms of hyperhydricity were observed during the 21 days of cultivation.

Keywords: bioreactors; tissue culture; micropropagation; yam

Introducción

La crisis de alimentos que azota al mundo es y continuará siendo uno de los principales obstáculos para el desarrollo de la humanidad. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), se estima que para el año 2050 la población mundial necesitará un 70 % más de alimentos que en la actualidad (Valdés, 2019).

Entre las raíces y tubérculos usados en la alimentación humana, el ñame (*Dioscorea spp.*) constituye un producto de alto valor nutricional para poblaciones rurales y urbanas (González, 2012), pero su producción está limitada por la poca disponibilidad de material vegetal de plantación, atribuido a que los tubérculos que constituyen la parte útil para la alimentación, también se utilizan como material de plantación (Iseki & Matsumoto, 2020).

Una alternativa para superar los problemas de disponibilidad y calidad de “semilla” en la propagación convencional del ñame, es mediante el empleo de las técnicas de cultivo *in vitro* (Cabrera et al., 2009; Sánchez et al., 2019). En tal sentido, existen referencias de la multiplicación de plantas de ñame en medios de cultivos semisólidos (Hussein et al., 2018), pero a pesar de sus ventajas implica altos costos de producción causados principalmente por las labores requeridas, el uso de agentes gelificantes y dificulta la semi-automatización.

No obstante, se disponen de otras tecnologías como los sistemas de inmersión temporal, que son más eficientes en términos de multiplicación de brotes en comparación con los medios de cultivo semisólidos (Gonzaga et al., 2016), donde parámetros de cultivo como la frecuencia y el tiempo de inmersión son determinantes para lograr su optimización (Etienne y Berthouly, 2002), pero en la actualidad es limitada la información existente a nivel internacional sobre su uso en la micropropagación de ñame (Balogun et al., 2017).

En Cuba, existen como antecedentes los trabajos en *Dioscorea cayenensis-rotundata* clon Blanco de Guinea (Cabrera et al., 2008), *D. alata* clones Pacala Duclos (Cabrera et al., 2009) y Belep (Cabrera et al., 2012), pero no existen referencias de su utilización en *D. alata* clon Chino Blanco.

Debido a la necesidad de potenciar el empleo de la micropropagación en la producción de semilla de ñame, se realizó este trabajo con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes tiempos y frecuencias de inmersión temporal, en la multiplicación de segmentos nodales en *Dioscorea alata* clon Chino Blanco.

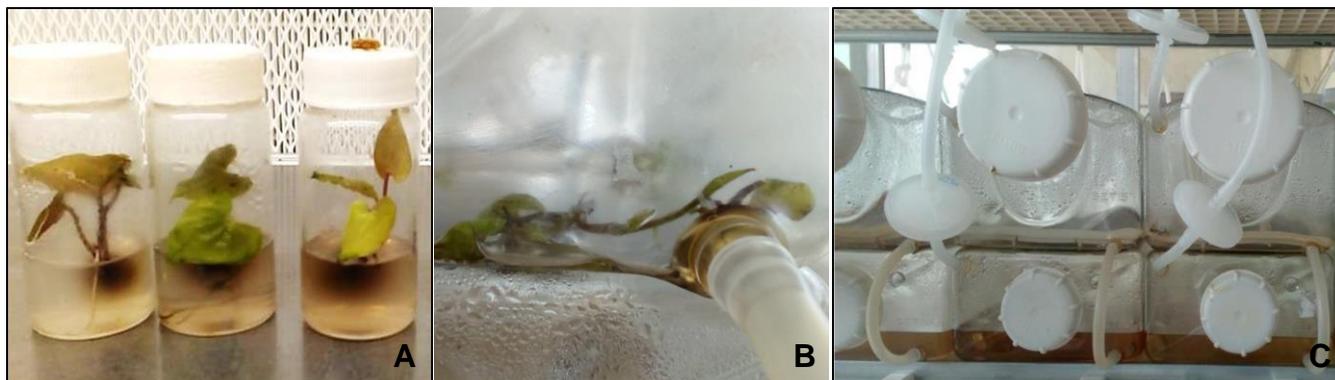
Materiales y métodos

La investigación se desarrolló en el Centro de Estudios de Biotecnología Vegetal, ubicado en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Granma, Cuba entre septiembre a diciembre de 2021.

Como material de partida se tomaron segmentos nodales con una yema axilar, a partir de plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco. Estas plantas se encontraban en medio de cultivo semisólido de multiplicación con las sales y vitaminas MS (Murashige y Skoog, 1962) 4,40 g.L⁻¹, cisteína 50 mg.L⁻¹, 6-bencilaminopurina (6-BAP) 0,5 mg.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹, ácido giberélico (AG₃) 1,0 mg.L⁻¹, Plant Agar 6,0 g.L⁻¹ y pH 5,8 (Figura 1A).

Después del segundo subcultivo los brotes fueron nuevamente seccionados para su multiplicación en Sistemas de Inmersión Temporal SETIS™ (Figura 1BC). Este sistema consiste en dos frascos superpuestos: uno para el crecimiento de las plantas y otro como reservorio del medio de cultivo. Cada frasco contó con filtros hidrofóbicos de 0,2 µm (Figura 1C), para garantizar la esterilidad del aire proveniente de un compresor accionado por un programador automático que permite el manejo adecuado de la frecuencia y duración de la inmersión.

Figura 1. Multiplicación de plantas *in vitro* de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco. a) Plantas de ñame en medio de cultivo semisólido a las tres semanas de cultivo. b) Multiplicación de ñame en medio de cultivo líquido en sistemas de inmersión temporal. c) Sistemas de inmersión temporal modelo SETIS™



El medio de cultivo circuló desde el frasco inferior al superior a través de una manguera de silicona ubicada en la parte inferior delantera de cada frasco, producto de la presión de aire emitido desde un compresor y regulado por un manómetro a 0,1 bar (Figura 1BC).

En todos los casos hubo renovación cíclica de la atmósfera gaseosa en el interior de los frascos de cultivo que contenían los explantes, mediante aireación forzada de un minuto de duración en los intervalos entre cada inmersión, para eliminar compuestos volátiles como el etileno.

Cada frasco de cultivo contenía 50 explantes en 1000 ml de medio de cultivo y se adicionaron 116 mg.L^{-1} de Vitrofurax, para el control de los microorganismos contaminantes y endofíticos.

Luego los frascos de cultivo que contenían los explantes, se colocaron en cámaras de crecimiento con luz solar indirecta, con una duración del fotoperíodo luminoso entre 11-12 horas, densidad del flujo de fotones fotosintéticos de $60\text{-}70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y una temperatura a $26 \pm 2,0 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 21 días de cultivo.

A continuación se describen los dos experimentos realizados con una secuencia consecutiva, que permitió fijar los factores estudiados en cada caso y que resultaron significativos.

Efecto del tiempo de inmersión

Para la determinación del tiempo de inmersión se conformaron tres tratamientos con una duración de cinco, diez y quince minutos, una frecuencia cada seis horas, para un total de cuatro inmersiones diarias en las condiciones y medio de cultivo descritos previamente.

Se evaluó el color de los brotes, número de brotes, longitud de los brotes (cm) y coeficiente de multiplicación al concluir las tres semanas de cultivo. Para determinar la longitud de los brotes, se empleó una regla graduada y se midió desde la base del tallo hasta la inserción de la primera hoja. El coeficiente de multiplicación, se obtuvo al dividir el número de segmentos nodales totales obtenidos al momento del subcultivo entre el valor inicial.

Efecto de la frecuencia de inmersión

Para el estudio de la frecuencia de inmersión se utilizaron cuatro frecuencias de inmersión cada 2, 4, 6 y 8 horas por día durante diez minutos de inmersión. Se empleó el medio de cultivo previamente descrito a razón de 20 ml por explante. A las tres semanas de cultivo se determinó el número de brotes, número de hojas, longitud del brote (cm) y coeficiente de multiplicación.

Análisis estadísticos

Se empleó un diseño completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Para determinar la normalidad de los datos se utilizó la prueba de Shapiro Wilks y homogeneidad de varianza según la prueba de Kolmogorov-Smirnov con el ajuste de Lillifore.

Los datos se procesaron estadísticamente mediante un análisis de varianza de clasificación simple. Para el análisis estadístico se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y las diferencias entre las medias se determinaron según la prueba de Mann Whitney con la penalización de Bonferroni ($p < 0,05$). Se empleó el programa estadístico SPSS versión PASW Statistics 18.

Análisis y discusión de los resultados

Efecto del tiempo de inmersión

Con este experimento se demostró que es posible la multiplicación de brotes de ñame clon Chino Blanco en sistemas de inmersión temporal. Se observó que los explantes iniciales, adquirieron una tonalidad oscura debido a la fenolización del tejido. Los brotes que elongaron a partir de la yema axilar presente en cada segmento nodal, se caracterizaron por tener hojas de color verde, opuestas, paralelinervias y de forma acorazonada, características típicas del genotipo; además durante el período evaluado no hubo formación de raíces, ni síntomas visibles de hiperhidricidad en los tejidos (Figura 2).

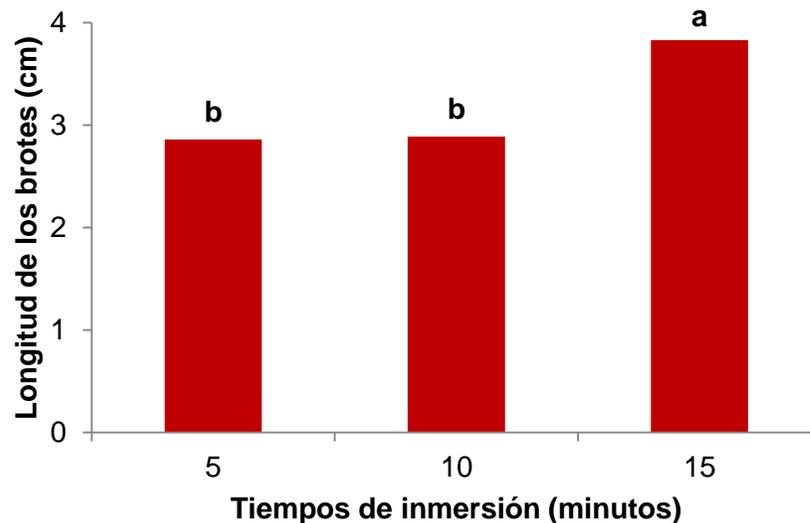
Figura 2. Plantas *in vitro* de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco obtenidas en sistemas de inmersión temporal SETIS™ a las tres semanas de cultivo



En el resto de las variables evaluadas, los resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. En este sentido, se observó una mayor elongación en los brotes regenerados y presencia de entrenudos más largos en el tratamiento con el mayor tiempo de inmersión utilizado, con diferencias estadísticas significativas en comparación con el resto de los tratamientos. Por el contrario, los tratamientos con tiempos de inmersión de 5 y 10 minutos de inmersión mostraron los menores valores sin diferencias significativas entre ellos (Figura 3).

Estos resultados son comparables con los publicados en la literatura científica referente a la especie *Dioscorea fordii*, donde la longitud de los brotes alcanzó los 5,7 cm en medio de cultivo basal MS con 6-BAP 1,0 mg.L⁻¹, ácido naftalenacético (ANA) 0,1 mg.L⁻¹, sacarosa 30 g.L⁻¹ y carbón activado 1,5 g.L⁻¹, en sistemas de inmersión temporal modelo Plantima[®] pero con tres minutos cada cuatro horas de inmersión (Yan et al., 2011), lo que difiere de la presente investigación.

Figura 3. Influencia del tiempo de inmersión en la longitud de los brotes de ñame clon Chino Blanco cultivados en sistemas de inmersión temporal con una frecuencia cada ocho horas durante 21 días de cultivo



Letras diferentes sobre las barras difieren significativamente según la prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Los valores obtenidos en el clon Chino Blanco, difieren de los descritos en el clon Pacala Duclos cultivadas en sistema de inmersión temporal tipo frascos gemelos (Cabrera et al., 2009). Según este autor, los brotes alcanzaron una longitud total de 20,80 cm después de seis semanas de cultivo. No obstante, sus resultados difieren de esta investigación en cuanto al genotipo, tipos de frascos, tiempo y frecuencia de inmersión con 10 minutos cada tres horas, condiciones de

cultivo que pudieron haber influido en la respuesta morfológica de las plantas *in vitro* del clon Chino Blanco.

Además se observó que el medio de cultivo presentaba una coloración oscura debido a la liberación de compuestos fenólicos de los tejidos en el clon Chino Blanco. Al respecto, existen evidencias de que estas sustancias fenólicas pueden presentar efectos tóxicos que afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro*, siendo necesario emplear compuestos como la cisteína, para controlar su liberación y evitar la oxidación de los tejidos.

Respecto al coeficiente de multiplicación los mejores resultados se obtuvieron en el segundo tratamiento con 10 minutos de inmersión cada seis horas, seguido del primer tratamiento que tenía el menor tiempo de inmersión evaluado, además duplicó el número de segmentos nodales formados con 15 minutos de inmersión (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del tiempo de inmersión en la multiplicación de segmentos nodales de ñame clon Chino Blanco en sistema de inmersión temporal SETIS™ a los 21 días de cultivo

Tratamientos	Tiempo de inmersión (minutos)	Coeficiente de multiplicación (U)	
		Medias	Rangos medio
1	5	3,20	29,30 b
2	10	4,80	44,20 a
3	15	2,30	18,00 c

Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente según la prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

Estos resultados difieren del mejor tiempo de inmersión para la longitud de los brotes, lo que indica que con el empleo de 10 minutos de inmersión los brotes tuvieron una menor elongación pero incrementó el número de segmentos nodales dado la menor separación de los entrenudos.

Al comparar los coeficientes de multiplicación promedio encontrados con 5 y 10 minutos de inmersión en tres semanas de cultivo, fueron comparables con los informados por Cabrera *et al.* (2004) en los clones Pacala Duclos (4,1) y Belep (3,9) ambos de la especie *Dioscorea alata*.

Algunos autores han informado un coeficiente de multiplicación de 1:4 en medios de cultivo semisólidos pero cada ocho semanas de cultivo (Chukwunalu et al., 2018), un periodo de tiempo superior al utilizado en la presente investigación, lo que ratifica la eficiencia del uso de esta tecnología cuando se ajustan las condiciones de cultivo para cada genotipo.

Por ejemplo, Cabrera et al. (2004) al comparar plantas *in vitro* de ñame clones Pacala Duclos y Belep, obtenidas en medio de cultivo semisólido como en sistemas de inmersión temporal, observaron en ambos clones que la longitud de los brotes (9,6 y 9,1 cm respectivamente) y el número de yemas axilares de las plantas procedentes de los sistemas de inmersión temporal duplicó la media de las plantas cultivadas en medio de cultivo semisólido.

En la literatura científica se aborda que los sistemas de inmersión temporal mejoraron el crecimiento y calidad de los brotes en *Dioscorea fordii* Prain et Burk (Yan et al., 2011). Según dichos autores, el coeficiente de multiplicación (5,0) en sistemas de inmersión temporal fue 2,6 veces mayor que en medio de cultivo semisólido y 1,2 veces superior al registrado en medio de cultivo líquido. Los brotes alcanzaron una longitud de 5,7 cm lo que superó los valores medios registrados (2,0 y 4,5 cm) en medios de cultivo semisólido y líquido respectivamente.

Debemos señalar que las condiciones de cultivo empleadas por Yan et al. (2011), difieren de las utilizadas en esta investigación, al referir el uso de sistemas de inmersión temporal modelo Plantima[®] con 250 ml de medio de cultivo cada contenedor; los explantes recibieron un menor tiempo de inmersión (tres minutos) pero aumentaron las inmersiones con una frecuencia cada cuatro horas; además realizaron el estudio en condiciones de iluminación artificial con una duración del período luminoso de 12/12 horas luz/oscuridad, una menor intensidad luminosa de alrededor de $25 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y un período de cultivo que alcanzó las seis semanas de cultivo.

Otros autores refieren que en medio de cultivo semisólido se obtienen aproximadamente cuatro segmentos nodales, y alrededor de ocho en sistemas de inmersión temporal después de ocho semanas de cultivo (Balogun et al., 2014). Esto pudiera ser atribuido al hecho de que en los sistemas de inmersión temporal hay un mayor contacto entre el medio de cultivo y el explante, mientras que en medio de cultivo semisólido existe una pequeña área de contacto entre los brotes propagados y los nutrientes del sustrato.

En este sentido, Salazar y Hoyos (2007), informaron la multiplicación de *Dioscorea alata* clon Pico de Botella en sistemas de inmersión temporal tipo RITA[®]. Estos investigadores obtuvieron como resultados que en condiciones similares a las utilizadas en este trabajo con un tiempo de inmersión de 10 minutos cada ocho horas, se obtenía la mayor formación de entrenudos y tamaño de las plantas, pero en un periodo de cuatro semanas de cultivo, lo cual demuestra diferencias estadísticas entre los niveles de este factor.

Agregan que los efectos de los tiempos de inmersión en la respuesta morfogénica de los tejidos pueden estar relacionados con las relaciones hídricas, el intercambio gaseoso y el incremento de la toma de nutrientes que se logra en esta forma de cultivo (Escalona et al., 1999), aspectos que de alguna forma favorecen el crecimiento y desarrollo del material vegetal.

Luego Polzin et al. (2014) trabajando con la especie *Dioscorea cayenensis-rotundata* clon 1568 en sistemas de inmersión temporal (RITA[®]), no encontraron diferencias estadísticas significativas entre tiempo de 5 a 20 minutos de inmersión con valores de 2,5 a 3,1 segmentos nodales, valores similares a los descritos en este trabajo. Mientras que con un minuto de inmersión cada doce horas, obtuvieron brotes con una media de 3,8 yemas axilares después de ocho semanas de cultivo; este valor es comparable con el obtenido en este experimento en el clon Chino Blanco con cinco minutos de inmersión pero con una frecuencia cada ocho horas.

Por su parte, Balogun et al. (2014), en seis genotipos estudiados, el mayor número de segmentos nodales a partir de una yema inicial ocurrió en *Dioscorea rotundata* clon TDr 95/19158 con ocho yemas, mientras que 14 yemas por brotes en *D. alata* clon TDa 98/01167, cultivados en sistemas de inmersión temporal SETIS™ durante ocho semanas. Agregaron que estos valores varían según el genotipo, la densidad de explantes, tiempos y frecuencias de inmersión.

En tanto, Balogun et al. (2017) refieren que el coeficiente de multiplicación en sistema de inmersión temporal varía de 3 a 12, al utilizar explantes de un solo nudo en un ciclo de 60 días, lo cual duplica lo obtenido en medios de cultivo semisólidos aunque puede variar según el genotipo.

Los sistemas de inmersión temporal SETIS™ también han sido empleados en otros cultivos como la morera (*Morus alba*) variedad Doña Betty. Al respecto, Bahí y Pérez (2021), observaron los mejores resultados en el tratamiento con dos minutos de inmersión cada ocho horas, lo cual difiere de los resultados alcanzados en ñame, lo que demuestra que el tiempo de inmersión debe ser ajustado para cada especie y variedad en estudio.

Efecto de la frecuencia de inmersión

La frecuencia de inmersión también influyó sobre la longitud de los brotes y el número de segmentos nodales. Los resultados indican que bajo estas condiciones se favorece la asimilación de nutrientes lo que estimuló el incremento de los valores medios en las variables evaluadas; además los brotes regenerados no formaron raíces, emitieron la formación de hojas y tuvieron un desarrollo morfológico normal (Figura 4).

En tal sentido, los mayores valores se obtuvieron cuando se realizó la inmersión del medio de cultivo cada seis horas para una media de cuatro inmersiones diarias. Con esa frecuencia de inmersión se tuvo una media del coeficiente de multiplicación de aproximadamente cuatro yemas axilares a los 21 días de cultivo (Tabla 2).

Figura 4. Plantas *in vitro* de ñame clon Chino Blanco en etapa de multiplicación con 10 minutos de inmersión cada seis horas en sistema de inmersión temporal SETIS™ a los 21 días de cultivo



Sin embargo, al compararlo con los resultados obtenidos en el experimento anterior, ambos con 10 minutos de inmersión cada ocho horas, se aprecia una disminución en la longitud de los brotes, este cambio en la respuesta biológica pudo ser debido al uso de explantes más pequeños, así como a variaciones en la iluminación debido a cambios ambientales, lo que provoca un retardo en la elongación de los brotes; aunque se lograron coeficientes de multiplicación con valores muy cercanos.

Por el contrario, este resultado difiere del tratamiento con inmersiones cada ocho horas, donde ocurrió el necrosamiento en los explantes, que provocó una menor formación de segmentos nodales y, en consecuencia, una disminución en el coeficiente de multiplicación (Tabla 2). Esto pudiera estar dado por una menor asimilación de los nutrientes al existir menor tiempo de contacto de los explantes con el medio de cultivo líquido y por tanto se reduce la entrada de agua a los tejidos, así como, una menor renovación de la atmósfera interna.

En tanto, cuando se realizaron inmersiones cada dos horas fue favorable para la longitud de los brotes y el coeficiente de multiplicación, pero afectó la formación de hojas y provocó hiperhidricidad en los tejidos, lo que pudiera estar atribuido a una mayor asimilación de

nutrientes y con una acumulación de agua en los tejidos como resultado de un mayor contacto con el medio de cultivo, pudiera limitar los procesos metabólicos como la fotosíntesis y la respiración (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto del tiempo de inmersión en la multiplicación de segmentos nodales de ñame clon Chino Blanco en sistema de inmersión temporal SETIS™ a los 21 días de cultivo

Tratamientos	Frecuencia de inmersión (horas)	Longitud de los brotes (cm)		Coeficiente de multiplicación (U)	
		Medias	Rangos medio	Medias	Rangos medio
1	2	2,00	46,48 a	2,14	39,43 b
2	4	1,24	29,76 c	1,47	31,03 bc
3	6	1,68	45,73 ab	3,85	62,95 a
4	8	1,40	37,53 bc	1,25	26,15 c

Letras diferentes en una misma columna difieren significativamente según la prueba de Mann-Whitney ($p < 0,05$)

En estudios previos en *Dioscorea alata* las frecuencias de inmersión cada 12 y 24 horas, mostraron menos posibilidades para asimilar nutrientes y acumular sustancias de reserva, comparadas con el tratamiento de cuatro inmersiones diarias (Cabrera et al., 2009).

Al realizar una comparación de los valores obtenidos en el tratamiento con inmersiones cada cuatro horas con los referidos por Yan et al. (2011) pero en el doble del tiempo de cultivo que el usado en la presente investigación, se aprecia una probable menor respuesta en el clon Chino Blanco en igual período de tiempo, lo que refleja diferencias entre genotipos y especies.

Mientras que en la malanga denominada *Xanthosoma sagittifolium* L. Schott, se incrementó la regeneración de brotes con una frecuencia de inmersión cada seis horas (Niemenak et al., 2013), un periodo de tiempo similar al utilizado en esta investigación.

Si bien los informes de investigación son relativamente escasos para compararlos con los resultados obtenidos en este trabajo, pueden señalarse los de Arano et al. (2020) en malanga (*Colocasia esculenta* L.) donde el empleo de dos minutos de inmersión cada cuatro horas, favoreció la formación y crecimiento de los brotes. Sin embargo, frecuencias cada dos u ocho

horas redujo el desarrollo de los brotes, resultado similar a lo ocurrido en la presente investigación. Según los autores esto pudo ser debido a que la malanga es una planta semi-acuática que requiere mayores demandas de agua para un desarrollo normal.

También Mancilla et al. (2021) tuvieron resultados similares en malanga, donde dos minutos de inmersión cada cuatro horas fueron suficientes para lograr coeficientes de multiplicación de 36 brotes, con una longitud de 4,50 cm después de 30 días de cultivo, lo que corroboró la eficiencia de los sistemas de inmersión temporal SETIS™ en la multiplicación de brotes y la variabilidad en la respuesta entre diferentes especies vegetales.

Conclusiones

1. Fue posible la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de *Dioscorea alata* clon Chino Blanco en Sistemas de Inmersión Temporal SETIS™.
2. Con el empleo de cuatro inmersiones diarias con intervalos cada seis horas y una duración de diez minutos, se obtuvo la mayor respuesta en el número de yemas y calidad morfológica de los brotes de ñame.

Referencias bibliográficas

- Arano, S., Gómez, F. C., Mancilla, E., Sánchez, R., & Bello, J. J. (2020). An efficient protocol for commercial micropropagation of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) using temporary immersion. *Scientia Horticulturae*, 261, 108998.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108998>
- Bahí, M., & Pérez, J. L. (2021). Multiplicación de brotes de morera variedad Doña Betty en Sistema de Inmersión Temporal. *Redel. Revista Granmense de Desarrollo Local*, 5(1), 64-73. <https://revistas.udg.co.cu/index.php/redel/article/view/2157>

- Balogun, M., Maroya, N., Asiedu, R., & Taiwo, J. (2014). *Novelty, rapidity and quality in seed yam production: The case of Temporary Immersion Bioreactors*. IITA.
- 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.
- Cabrera, M., Basail, M., Torres, Y., Robaina, A., Santos, A., Medero, V., Rayas, A., López, J., García, M., Ventura, J., & Oliva, M. (2004). Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal para la multiplicación de segmentos nodales de *Dioscorea alata* L. en el clon 'Pacala Duclos'. *Biotecnología Vegetal*, 4(1), 3-8.
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/293>
- Cabrera, M., Gómez, R., Rodríguez, S., López, J., Rayas, A., Basail, M., Santos, A., Medero, V., & Rodríguez, G. (2008). Multiplicación *in vitro* de segmentos nodales del clon de ñame Blanco de Guinea (*Dioscorea cayenensis-D. rotundata*) en sistemas de cultivo semiautomatizado. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 97-103.
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/9182>
- Cabrera, M., Gómez, R., Rayas, A., De Feria, 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*, 11(2), 19-30.
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11678>
- Cabrera, M., Gómez, R., Espinosa, E., & Espinosa, A. (2012). Efficiency of semi-automated culture systems on microtubers formation of yam (*Dioscorea alata* L.). *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 16(1), 45-47. <https://popups.uliege.be/1780-4507/index.php?id=8373>

- Chukwunalu, O., Balogun, M., Maroya, N., & Asiedu, R. (2018). *Development of micropropagation system for yam (Dioscorea spp.) using somatic embryogenesis*. IITA.
<https://biblio1.iita.org/handle/20.500.12478/5521>
- Escalona, M., Lorenzo, J., González, B., Daquinta, M., Barroto, C., González, J., & Desjardines, Y. (1999). Pineapple (*Annanas comosus* Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743-748. <https://doi.org/10.1007/s002990050653>
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231.
<https://doi.org/10.1023/A:1015668610465>
- Gonzaga, L., López, R., & Morales, T. (2016). Micropropagation of *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae) using a temporary immersion system RITA[®]. *African Journal of Biotechnology*, 15(28), 1503-1510. <https://doi.org/10.5897/AJB2016.15390>
- González, M. E. (2012). El ñame (*Dioscorea* sp.): Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 5-15.
<https://ediciones.inca.edu.cu/index.php/ediciones/article/view/184>
- Hussein I., Mengs, B., & Matiwos, 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>
- Iseki, 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>

- Mancilla, E., Pérez, J. A., Núñez, R., Spinoso, J. L., & Bello, J. J. (2021). Comparison of different Semi-Automated Bioreactors for *in vitro* propagation of taro (*Colocasia esculenta* L. Schott). *Plants*, 10, 1010. <https://doi.org/10.3390/plants10051010>
- Niemenak, N., Mboene Noah, A., & Ndoumou Omokolo, D. (2013). Micropropagation of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) in temporary immersion bioreactor. *Plant Biotechnology Reports*, 7(3), 383–390. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0272-5>
- Polzin, F., Sylvestre, I., Déchamp, E., Ilbert, P., Etienne, H., & Engelmann, F. (2014). Effect of activated charcoal on multiplication of African yam (*Dioscorea cayenensis-rotundata*) nodal segments using a temporary immersion bioreactor (RITA®). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(2), 210-216. https://www.researchgate.net/profile/F-Engelmann/publication/263245437_Effect_of_activated_charcoal_on_multiplication_of_African_yam_Dioscorea_cayenensis-rotundata_nodal_segments_using_a_temporary_immersion_bioreactor_RITA_R/links/55b7609608ae092e965712d9/Effect-of-activated-charcoal-on-multiplication-of-African-yam-Dioscorea-cayenensis-rotundata-nodal-segments-using-a-temporary-immersion-bioreactor-RITA-R.pdf
- Salazar, R., & Hoyos, R. A. (2007). Multiplicación y tuberización in vitro de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 60(2), 3907-3921. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/24418>
- Sánchez, L. A., Labrada, E. D., & Borges, M. (2019). Evaluación morfológica de plantas de ñame (*Dioscorea* spp.) procedentes de tubérculos sanos a los cuatro y siete meses de

edad. *Redel. Revista Granmense De Desarrollo Local*, 3(1), 138-145.

<https://revistas.udg.co.cu/index.php/redel/article/view/686>

Valdés, E. (2019) *Caracterización de potyvirus en Dioscorea spp. en el Banco de Germoplasma de ñame del INIVIT* [Tesis de Diploma, Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas], Santa Clara, Villa Clara, Cuba.

<https://dspace.uclv.edu.cu/handle/123456789/11407>

Yan, H., Yang, L., & Li, Y. (2011). Improved growth and quality of *Dioscorea fordii* Prain et Burk and *Dioscorea alata* plantlets using a temporary immersion system. *African Journal of Biotechnology*, 10(83), 19444-19448.

<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/99066>