

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO, FRECUENCIA DE INMERSIÓN Y NÚMERO INICIAL DE BROTES, EN LA MICROPROPAGACIÓN DE LA MALANGA VIEQUERA (*XANTHOSOMA SP.*) EN SISTEMAS DE INMERSIÓN TEMPORAL.

Arletys Santos, Manuel Cabrera, Jorge López, Aymé Rayas, Yoel Beovides, Milagros Basail, Victor Medero, Diosdada Gálvez, Damicela Reinaldo, Maricel Bauta, Alexis Ortega.

Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Cuba.

INTRODUCCIÓN

En Cuba, el género de Malanga *Xanthosoma* es el de mayor demanda en la preferencia de la población con relación a otras aráceas comestibles. Su producción ha aumentado en los últimos años en detrimento de las áreas del género *Colocasia*, sobre todo porque esta última requiere un mayor consumo de agua (MINAG, 2004).

Una alternativa novedosa aún en la micropropagación de plantas lo constituye, el empleo del Sistema de Inmersión Temporal (SIT), basado en el contacto intermitente del medio de cultivo con los explantes, lo cual permite una mayor facilidad para el desarrollo de los procesos a gran escala y el aumento de la productividad del material propagado, lo que representa una reducción en los costos de producción (Berthouly y Etienne, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT)Se utilizó el clon de malanga 'Viequera' (*Xanthosoma spp.*) procedente del Banco de Germoplasma del INIVIT.

Efecto del tipo de sistema de cultivo en la multiplicación de brotes de yemas axilares.

Con el objetivo de evaluar el efecto de dos sistemas de cultivo semi-automatizados en la fase de multiplicación de los brotes de yemas axilares, en comparación con el sistema de cultivo de inmersión de los brotes de yemas axilares en medio de cultivo líquido estático sin renovación de la atmósfera interna (SLE) (control), se evaluaron los sistemas de cultivo siguientes: Sistema de cultivo I: Sistema de Inmersión Temporal (SIT): Formado por dos frascos de cultivo de vidrio de 250 mL. Se utilizó un tiempo de inmersión de siete minutos y una frecuencia de inmersión cada dos horas (12 inmersiones por día); Sistema de cultivo II: Sistema de Inmersión constante con aireación mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo (SIC); Sistema de cultivo III (Control): Sistema de cultivo de inmersión estático sin renovación de la atmósfera interna (SLE) A los 21 días de cultivo, se evaluó: Número de hojas de los brotes de yemas axilares; Altura de los brotes de yemas axilares (cm); Coeficiente de multiplicación de los brotes de yemas axilares; Masa fresca de los brotes de yemas axilares (gMF); Masa seca de los brotes de yemas axilares (gMF); Número total de brotes de yemas axilares con síntomas de hiperhidridad.

Los datos se procesaron estadísticamente mediante análisis de varianza de clasificación simple (completamente al azar) y la comparación múltiple de media se realizó según Tukey cuando se encontró homogeneidad de varianza, en los casos contrarios se aplicó Dunnent's C con un nivel de significación de $p < 0,05$ lo cual se especifica en cada uno de los resultados.

Efecto del tiempo de inmersión en el sistema de inmersión temporal.

Con el objetivo de determinar el tiempo de inmersión de los brotes de yemas axilares en el medio de cultivo se estudiaron tres tiempos: siete, 14 y 21 minutos cada dos horas (12 inmersiones por día). Se colocaron cuatro brotes de yemas axilares y un volumen de 10 mL de medio de cultivo por cada explante utilizado en el SIT.

Efecto de la frecuencia de inmersión en el sistema de inmersión temporal.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la frecuencia de inmersión de los explantes en el medio de cultivo sobre el crecimiento de los brotes de yemas axilares, se estudiaron, tres frecuencias de inmersión, cada dos, cuatro y seis horas por día, con el mejor tiempo de inmersión obtenido

como resultado en las variables evaluadas en el experimento anterior. Se colocaron cuatro brotes de yemas axilares y 10 mL de medio de cultivo por brote de yema axilar en el SIT.

Efecto del número inicial de brotes.

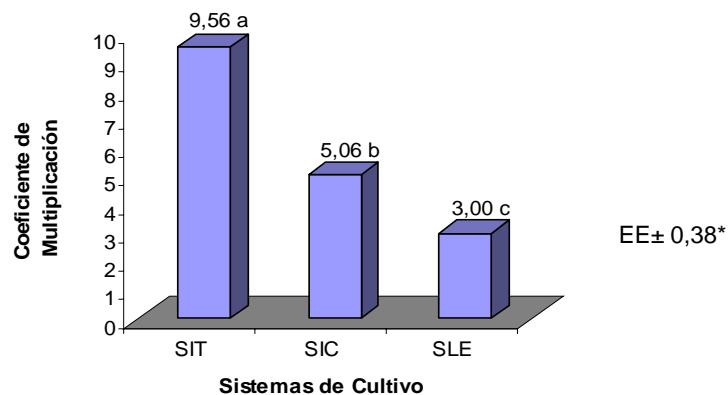
Con el objetivo de determinar el efecto del número de brotes de yemas axilares colocados en el SIT se estudiaron tres densidades iniciales de brotes de yemas axilares por SIT: 4, 8 y 12.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tipo de sistema de cultivo en la multiplicación de los brotes de yemas axilares.

Con el empleo del SIT se logró el mejor coeficiente de multiplicación, con diferencias significativas respecto a los demás sistemas de cultivo empleados (Figura 1) en la multiplicación del clon de malanga 'Viequera'.

Los brotes de yemas axilares cultivados en el SIT mostraron los mejores resultados en la multiplicación, para la altura de los brotes, número de hojas por planta, peso fresco y peso seco, con diferencias significativas respecto al sistema de inmersión constante con aireación mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo y el sistema de cultivo estático sin renovación de la atmósfera interna utilizado como control (tabla 1).



Medias con letras no comunes en las barras difieren estadísticamente para $p<0,05$ según la prueba de Tukey.

Figura 1. Efecto del tipo de sistema de cultivo sobre el coeficiente de multiplicación en el clon de malanga 'Viequera' a los 21 días de cultivo.

Tabla 1. Efecto del tipo de sistema de cultivo evaluado en la fase de multiplicación de los brotes de yemas axilares a los 21 días de cultivo en el clon de malanga 'Viequera'.

Sistema de Cultivo	Número de Hojas	Altura de los Brotes (cm)	Peso Fresco (gMF)	Peso Seco (gMS)
SIT	2,18 a	1,82 a	1,99 a	0,20 a
SIC	0,87 b	1,20 b	1,12 b	0,11 b
SLE	0,00 c	0,86 c	0,44 c	0,04 c
EE ±	0,16**	0,13**	0,11**	0,01**

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren estadísticamente para $p<0,05$ según la prueba de Tukey.

Los brotes de yemas axilares cultivados en el SIT se caracterizaron por un mejor crecimiento, coloración verde y hojas más desarrolladas, a diferencia de los brotes cultivados en el resto de los sistemas de cultivo que presentaron tallos y hojas translúcidas, con apariencia turgente. Con el empleo del SLE se observaron brotes de yemas axilares cloróticos y con síntomas de hiperhidrididad.

En la bibliografía consultada no se encontró otra referencia sobre esta temática en el cultivo de la malanga, por lo cual los resultados se discuten con otros cultivos de la familia Araceae.

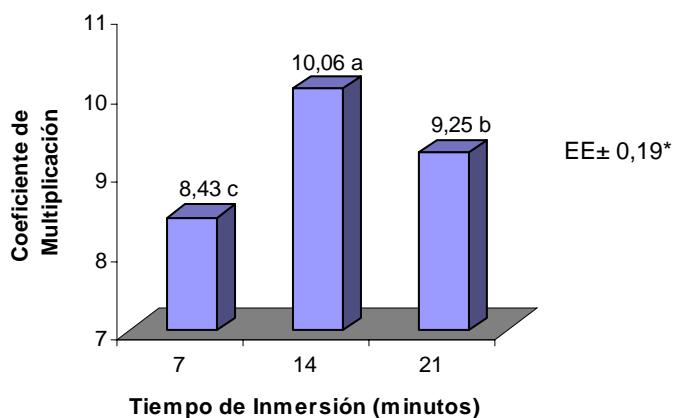
Escalona (2006) hace una comparación entre las ventajas que ofrece la multiplicación en SIT, respecto a la multiplicación convencional en Araceas ornamentales. Los coeficientes de multiplicación se incrementaron en *Syngonium* de 7,3 a 28,0; *Ptylodendrum* de 3,0 a 103,0; *Anthurium* de 3,5 a 79,8 y en *Spathiphyllum* de 3,7 a 61,5 con el empleo del SIT.

Paek *et al.* (2008) en la multiplicación de *Alocasia amazonica*, compararon el SIT y el birreactor de inmersión continua, logrando los mejores resultados para la multiplicación de los brotes utilizando el SIT.

Efecto del tiempo de inmersión en el sistema de inmersión temporal.

El tiempo de inmersión en el SIT influyó de forma significativa en el coeficiente de multiplicación. Con 14 minutos de inmersión se alcanzó los mejores resultados, con diferencias significativas respecto al resto de los tratamientos (Figura 2).

Con tiempos de inmersión de 14 y 21 minutos en el SIT se obtuvo los mejores resultados en la multiplicación de los brotes de yemas axilares, para las variables número de hojas, altura y peso fresco, sin diferencias significativas entre ellos (tabla 2) pero si en el peso seco y coeficiente de multiplicación.



Medias con letras no comunes en las barras difieren estadísticamente para $p<0,05$ según la prueba de Dunnett's C.

Figura 2. Efecto del tiempo de inmersión en el SIT sobre el coeficiente de multiplicación en el clon de malanga 'Viequera' a los 21 días de cultivo.

Tabla 2. Efecto del tiempo de inmersión en el sistema de inmersión temporal evaluados en la multiplicación de los brotes de yemas axilares a los 21 días de cultivo en el clon de malanga 'Viequera'.

Tiempo de inmersión	Número de Hojas	Altura (cm)	Peso Fresco (gMF)	Peso Seco (gMS)
7 minutos	1,75 b	1,39 b	1,62 b	0,16 c
14 minutos	2,31 a	2,11 a	2,16 a	0,23 a
21 minutos	1,87 ab	1,72 ab	1,79 ab	0,19 b
EE ±	0,15*	0,16*	0,13*	0,01**

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren estadísticamente para $p<0,05$ según la prueba Tukey.

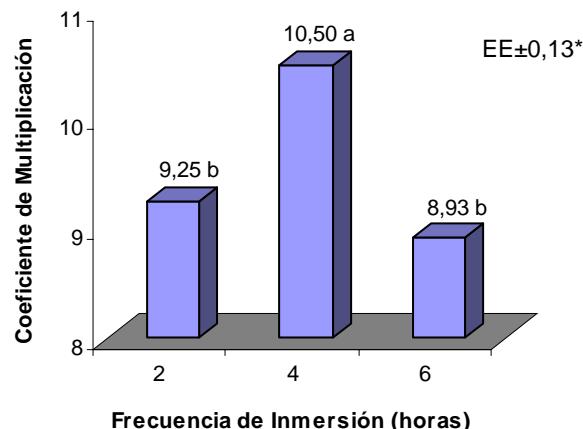
El tiempo de inmersión de 14 minutos favoreció el coeficiente de multiplicación de los brotes de yemas axilares debido a que propició mayor disponibilidad de nutrientes a los mismos en comparación con un tiempo de inmersión de siete minutos.

En la multiplicación en SIT del clon de malanga 'Méjico 8', se logró un coeficiente de multiplicación de 13,8 con el empleo de un tiempo de inmersión de siete minutos en frascos Clerboys (Nalgene, USA) de 10,00 L de capacidad (Dottin, 2000).

Basail (2005) obtuvo el mejor resultado para la variable coeficiente de multiplicación (9,10) cuando utilizó 10 minutos de inmersión de los explantes en el medio de cultivo, en el cv. híbrido de plátano vianda 'FHIA 21' (AAAB).

Efecto de la frecuencia de inmersión en el sistema de inmersión temporal.

Al evaluar el coeficiente de multiplicación con la frecuencia de inmersión cada cuatro horas en el SIT se obtuvieron los mejores resultados con diferencias significativas en relación al resto de los tratamientos (figura ^`



Medias con letras no comunes en una misma barra difieren estadísticamente para $p<0,05$ según la prueba de Dunnett's C.

Leyenda: EE: Error estándar

Figura 3. Efecto de la frecuencia de inmersión en SIT, sobre el coeficiente de multiplicación en el clon de malanga 'Viequera' a los 21 días de cultivo.

Al utilizar la frecuencia de inmersión cada cuatro horas en el SIT se alcanzó los mejores resultados en la multiplicación de los brotes de yemas axilares, para las variables evaluadas (tabla 3). Estos brotes se caracterizaron por su coloración verde y desarrollo foliar.

Tabla 3. Efecto de la frecuencia de inmersión en el sistema de inmersión temporal evaluadas en la multiplicación de los brotes de yemas axilares a los 21 días de cultivo en el clon de malanga 'Viequera'.

Frecuencia de inmersión	No de Hojas	Altura (cm)	Peso Fresco (gMF)	Peso Seco (gMS)
2 horas	2,00 b	1,48 c	1,83 b	0,18 b
4 horas	2,56 a	2,10 a	2,16 a	0,23 a
6 horas	1,81 b	1,77 b	1,57 c	0,16 b
EE ±	0,10**	0,05**	0,04**	0,01**

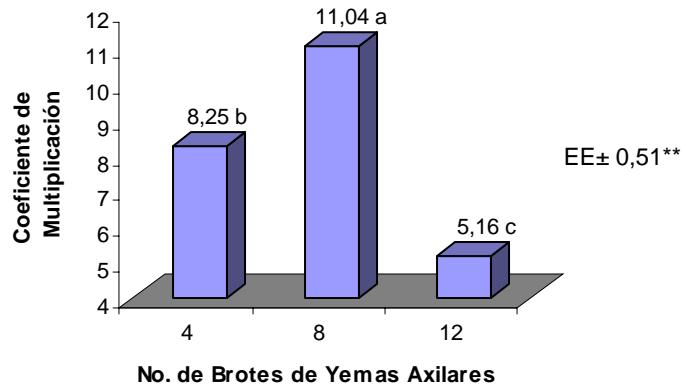
Medias con letras no comunes en una misma columna difieren estadísticamente para $p<0,05$ según la prueba de Dunnett's C..

Dottin (2000) en la multiplicación del clon 'Méjico 8' (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott), al emplear una frecuencia de inmersión cada cuatro horas logró también un mejor desarrollo de los brotes de yemas axilares e incrementó el coeficiente de multiplicación a 14,50 en frascos de cultivo Clerboys (Nalgene, USA) de 10,00 L de capacidad, lo cual apoya los resultados obtenidos en este trabajo.

La mejor respuesta para el crecimiento de los brotes de yemas axilares en el SIT se obtuvo cuando se empleó un tiempo de inmersión de 14 minutos y una frecuencia de inmersión cada cuatro horas.

Efecto del número inicial de brotes de yemas axilares.

Se obtuvo como mejor tratamiento cuando se utilizó ocho brotes de yemas axilares como explante inicial, en la multiplicación del clon de malanga 'Viequera', con diferencia significativa con el resto de los tratamientos (Figura 4).



Medias con letras no comunes en una misma barra difieren estadísticamente para $p<0,05$ según la prueba de Dunnett's C.

Leyenda: EE: Error estándar

Figura 4. Efecto del número de brotes de yemas axilares colocados en el SIT, sobre el coeficiente de multiplicación a los 21 días del cultivo en el clon del malanga 'Viequera'.

Se logró los mejores resultados en la fase de multiplicación de los brotes de yemas axilares, cuando se colocaron ocho brotes por SIT, para las variables peso fresco y peso seco con diferencias significativas respecto al resto del número inicial de brotes de yemas axilares empleados en el SIT (tabla 4).

Tabla 4. Efecto del número de brotes de yemas axilares colocados en el SIT en la fase de la multiplicación, a los 21 días del cultivo en el clon de malanga 'Viequera'.

Número de brotes de yemas axilares	No de Hojas	Altura (cm)	Peso Fresco (gMF)	Peso Seco (gMS)
4	2,00 ab	1,90 ab	1,34 b	0,09 b
8	2,16 a	1,91 a	1,93 a	0,27 a
12	1,44 b	1,43 b	0,85 c	0,11 b
EE±	0,20*	0,13*	0,08*	0,03*
	Dunnett's C	Tukey	Dunnett's C	Dunnett's C

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren estadísticamente para $p<0,05$ según la prueba especificada.

Con el empleo de ocho brotes de yemas axilares por SIT, se logró un mejor aprovechamiento de la capacidad del SIT en comparación con cuatro brotes de yemas axilares y se obtuvo la mejor respuesta en el coeficiente de multiplicación de los mismos.

Cuando se colocaron 12 brotes de yemas axilares por SIT, se presentaron brotes con apariencias cloróticas y con un menor coeficiente de multiplicación. Este resultado pudo estar relacionado a la existencia de competencias entre los brotes de yemas axilares por la iluminación y disponibilidad de CO_2 . Según Tisserat y Silman (2000) las altas densidades de cultivo por frasco de cultivo afectan el crecimiento individual de los brotes y a su vez señalaron

que esto podría ser solamente revertido por un incremento en la capacidad del frasco de cultivo o por el empleo de una atmósfera enriquecida con CO₂.

Conclusiones

Los resultados alcanzados en el trabajo permitieron arribar a las conclusiones siguientes:

1. Se demostró la superioridad del Sistema de Inmersión Temporal, respecto al Sistema de Inmersión constante con aireación mediante burbujeo continuo en el medio de cultivo y el Sistema Líquido Estático, en el coeficiente de multiplicación (9,56) de brotes de yemas axilares en el clon 'Viequera'.
2. Se determinó que para un SIT formado por frascos de 250 ml con un tiempo de 14 minutos de inmersión cada cuatro horas y 8 brotes por frasco se obtiene el mejor coeficiente de multiplicación 10,50.

Referencias Bibliográficas

- Basail, Milagros (2005) Multiplicación en sistema de inmersión temporal del cultivar híbrido 'FHIA 21' (AAAB). Tesis de Maestría. Universidad Central de Las Villas, Instituto de Biotecnología de las Plantas. Cuba. 85 p.
- Berthouly, M y Etienne H (2005) Temporary immersion systems: a new concept for use liquid medium in mass propagation. En: Hvoslef-Eide A. K. y Preil W. (Ed). Liquid Culture Systems or *in vitro* Plant Propagation. pp. 165-195.
- Dottin, M (2000) Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Tesis presentada para optar por el grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de las villas. Santa Clara, Cuba.
- Escalona, Maritza (2006) Temporary inmersion beats traditional techniques on all fronts. Prophita annual. pp48-50.
- MINAGRI (2004) Instructivo Técnico del Cultivo de la Malanga. Castellanos, P. (Ed). SEDGRI/AGRINFOR, Ciudad de La Habana, Cuba, 12 p.
- Paek, KY, Murthy U A, Jo HN y Hahn E J (2008) Micropropagation of *Alocasia amazonica* using semisolid and liquid cultures. *In vitro* Cellular & Developmental Biology – Plant. 44(1). 26-32.
- Tisserat, B y Silman R (2000) Interaction of cultures vessels, media volume, culture density, and carbon dioxide levels on lettuce and spearmint shoot growth *in vitro*. Plant Cell Reports. 19: 464-471.