



# **COLEGIO DE POSTGRUADOS**

**INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**CAMPUS CÓRDOBA**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA  
SUSTENTABLE**

**OPTIMIZACIÓN EN LA MICROPROPAGACIÓN DE**

**MALANGA (*Colocasia esculenta* L. Schott)**

**UTILIZANDO BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL**

**SAMANTHA ARANO AVALOS**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**AMATLÁN DE LOS REYES, VERACRUZ, MÉXICO**

**2019**

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS  
REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el (la) que suscribe **Samantha Arano Avalos**, Alumno(a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del profesor(a) **Dr. Jericó Jabín Bello Bello**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **OPTIMIZACIÓN EN LA MICROPROPAGACIÓN DE MALANGA (*Colocasia esculenta* L. Schott) UTILIZANDO BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL** Y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Profesor Consejero(a) o Director(a) de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Amatlán de los Reyes, Veracruz a **20 de junio de 2019**



---

Firma



---

Vo.Bo. del Profesor Consejero o Director de Tesis

La presente tesis, titulada: **OPTIMIZACIÓN EN LA MICROPROPAGACIÓN DE MALANGA (*Colocasia esculenta* L. Schott) UTILIZANDO BIORREACTORES DE INMERSIÓN TEMPORAL**, realizada por la alumna: **Samantha Arano Avalos**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**INNOVACIÓN AGROALIMENTARIA SUSTENTABLE**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO:

  
\_\_\_\_\_  
DR. JERICÓ JABÍN BELLO BELLO

ASESOR INTERNO:

  
\_\_\_\_\_  
DR. JUAN ANTONIO PÉREZ SATO

ASESOR EXTERNO:

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOSÉ HUMBERTO CAAMAL VELÁZQUEZ

# OPTIMIZACIÓN DE LA MICROPROPAGACIÓN DE MALANGA (*Colocasia esculenta* L. Schott) USANDO UN SISTEMA DE INMERSIÓN TEMPORAL

Samantha Arano Avalos, M. C.

Colegio de Postgraduados, 2019.

## RESUMEN

Los sistemas de inmersión temporal permiten la semiautomatización y reducen los costos de producción durante la micropropagación a escala comercial. El objetivo de este estudio fue evaluar la inmersión temporal (IT) como técnica de micropropagación y aclimatización de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) cv. Criolla. Explantes con dos brotes previamente establecidos *in vitro* fueron cultivados en diferentes sistemas de cultivo: medio semisólido e IT usando el sistema de frascos gemelos. El efecto del sistema de cultivo, frecuencia de inmersión y volumen de medio de cultivo por explante sobre la multiplicación de malanga fue evaluado después de 30 días de cultivo. Las variables a evaluar fueron: número de brotes por explante, longitud de brote y número de hojas, además de contenido de clorofila y supervivencia en aclimatización. El diseño experimental usado en todos los experimentos fue completamente al azar, con tres repeticiones. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de rango de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Los resultados mostraron diferencias significativas en las variables evaluadas entre los diferentes sistemas de cultivo. La mayor producción de brotes se obtuvo en IT con  $15.80 \pm .46$  brotes por explante, aproximadamente 2.68 veces más que el sistema semisólido con  $5.90 \pm .29$  brotes por explante. La frecuencia de inmersión y la cantidad de medio de cultivo por explante también mostró diferencias significativas. La mayor producción de brotes se encontró en cada 4 h con 25 mL por explante. Siendo cada 4 h con 100 mL por explante en donde se encontró menos producción. Además, se observó un incremento de clorofila en IT en comparación con el sistema semisólido. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la aclimatización.

**Palabras clave:** BIT (Biorreactor de Inmersión Temporal), Frecuencia de Inmersión, Clorofila, Aclimatización.

**IMPROVING MICROPROPAGATION OF MALANGA (*Colocasia esculenta* L. Schott)  
USING A TEMPORARY IMMERSION SYSTEM**

Samantha Arano Avalos, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2019.

**ABSTRACT**

Temporary immersion systems allow semi-automatization and reduce production costs during micropropagation on a commercial scale. The objective of this study was to evaluate temporary immersion (TI) as a technique for commercial micropropagation of malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) cv. Criolla. The effect of the semi-solid and liquid medium culture systems was compared using the Temporary Immersion Bioreactor (TIB). For the TIB culture system, the effects of immersion frequency and volume of culture medium per explant on shoot development were evaluated. A completely randomized experimental design was used for all experiments, which were replicated three times. At 30 d of culture, the number of shoots per explant, shoot length and number of leaves per shoot were evaluated. In addition, the chlorophyll content and survival in plantlets were evaluated in the different culture systems. To evaluate the immersion frequency and culture medium volume per explant, an analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's range test ( $p \leq 0.05$ ) were performed using SPSS statistical software (version 22 for Windows). For acclimatization, plant survival (%) was evaluated after 30 days. When comparing the culture systems, the highest shoot production, shoot length and number of leaves per shoot were obtained in TI with an immersion frequency of 2 min every 4 h and with a volume of culture medium of 25 and 50 ml per explant. An increase in chlorophyll content in TI was observed with an immersion frequency every 4 h and with a culture medium volume of 50 and 100 ml per explant. Regarding the percentage of survival during acclimatization, no significant differences were observed between culture systems, immersion frequencies and volume of culture medium per explant. In conclusion, the evaluated immersion system is an alternative for commercial micropropagation of malanga.

**Keywords:** TIB (Temporary Immersion Bioreactor), Immersion Frequency, Chlorophyll, Acclimatization.

## AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiese sido posible sin la aportación de los distintos agentes tanto humanos como institucionales, los cuales cito a continuación.

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT):** Gracias por el financiamiento de mis estudios de posgrado.

**SAGARPA-CONACYT:** Agradezco el financiamiento del presente trabajo el cual es parte del mega-proyecto denominado “Aprovechamiento de la diversidad genética y desarrollo de tecnología sustentable de producción, beneficio y manejo poscosecha de malanga en México”, proveniente del fideicomiso con recursos concurrentes denominado “Fondo Sectorial de Investigación en materia Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos”.

**Colegio de Posgraduados Campus Córdoba:** Agradezco de manera infinita la oportunidad que me dieron de continuar mis estudios, a través de la maestría de IAS, en una institución de tanto prestigio como esta. Así como agradezco que me permitieran usar sus instalaciones para realizar el presente trabajo y adquirir conocimiento de personal tan capacitado y apreciado con el que cuenta el campus.

**Consejo particular:** Al Dr. Pérez-Sato y Dr. Caamal-Velázquez gracias por las aportaciones que realizaron para la mejora de este trabajo.

**Dr. Jericó Bello:** Agradezco su paciencia, apoyo y la oportunidad de pertenecer a la familia del Laboratorio de Cultivos Vegetales.

**A mi familia:** Gracias a mi madre, hermano y abuelos (Celia y Heriberto) por su amor infinito y apoyo incondicional. Porque a pesar de las adversidades siempre creyeron en mí.

**A mis compañeros de laboratorio:** Agradezco a todos y cada uno por su apoyo en momentos difíciles, por siempre animarme y ser solidarios. En especial agradezco a Raymundo que siempre estuvo conmigo hasta tarde cuando tenía que evaluar mi experimento y que de manera atenta se ofrecía a ayudarme.

# CONTENIDO

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN.....   | iv |
| ABSTRACT.....  | v  |
| AGRADECIMIENTOS.....   | vi |
| LISTA DE CUADROS.....  | ix |
| LISTA DE FIGURAS.....  | x  |
| I. INTRODUCCIÓN.....   | 1  |
| II. OBJETIVO GENERAL.....                                    | 3  |
| 2.1 Objetivos particulares.....                              | 3  |
| III. HIPÓTESIS.....  | 4  |
| IV. MARCO TEÓRICO.....                                       | 5  |
| 1.-Importancia de la malanga.....                            | 5  |
| 1.1.- Importancia socio cultural.....                        | 6  |
| 1.2.- Seguridad alimentaria.....                             | 6  |
| 2.- La malanga en México.....                                | 7  |
| 3.- Generalidades del cultivo.....                           | 7  |
| 4.- Propagación de la malanga.....                           | 9  |
| 5.- Micropropagación.....                                    | 11 |
| 5.1.- Etapas de la micropropagación.....                     | 11 |
| 6.- Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).....                | 13 |
| 6.2.- Impacto de los SIT en la producción de plantas.....    | 14 |
| 5.1 Material Vegetal.....                                    | 15 |
| 5.2 Evaluación de los diferentes sistemas de cultivo.....    | 16 |
| 5.3 Evaluación de la frecuencia de inmersión.....            | 16 |
| 5.4 Efecto del volumen de medio de cultivo por explante..... | 16 |
| 5.5 Contenido de clorofila.....                              | 17 |
| 5.6 Aclimatización <i>ex vitro</i> .....                     | 17 |
| 5.7 Diseño experimental y análisis de datos.....             | 18 |
| VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....                              | 19 |
| 6.1 Evaluación de los diferentes sistemas de cultivo.....    | 19 |
| 6.2 Evaluación de la frecuencia de inmersión.....            | 21 |
| 6.3 Efecto del volumen de medio de cultivo por explante..... | 22 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>6.4 Contenido de clorofila.....</b> | <b>24</b> |
| <b>VII. CONCLUSIONES.....</b>          | <b>28</b> |
| <b>VII. LITERATURA CITADA .....</b>    | <b>29</b> |



## LISTA DE CUADROS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Cuadro 1.</b> Efecto del sistema de cultivo, frecuencia de inmersión y volumen de medio por explante sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de malanga ( <i>Colocasia esculenta</i> ) en BIT | <b>28</b> |
|--|-----------|

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efecto del Sistema de cultivo y frecuencias de inmersión en SIT en la multiplicación *in vitro* de malanga a) medio semisólido, b-e) inmersión temporal durante 2 min cada 4, 8 y 12 h respectivamente. .... 30
- Figura 2.** Efecto del volumen de medio de cultivo por explante en la etapa de multiplicación *in vitro* de malanga. Inmersión Temporal durante 2 min cada 4 h con a) 100 mL, b) 50 mL y c) 25 mL por explante. .... 33
- Figura 3.** Contenidos de clorofila durante la etapa multiplicación de malanga después de 30 días de cultivo *in vitro*. Efecto de a) Sistema de cultivo y b) volumen de medio por explante. .... 35
- Figura 4.** Plántulas aclimatizadas de malanga obtenidas de BIT a los 30 días de cultivo *ex vitro* bajo condiciones de invernadero..... 37

## I. INTRODUCCIÓN

La malanga o taro (*Colocasia esculenta* L. Schott), es una hortaliza comestible con alto contenido de almidón en su raíz con alto valor nutricional que se cultiva en áreas tropicales del mundo (Grimaldi *et al.*, 2018). Ésta es consumida como harina, pasta, productos enlatados, barras de cereal, bebidas en polvo y papas.

La malanga se propaga vegetativamente por rizomas; sin embargo, este método de multiplicación no garantiza la calidad fitosanitaria de propágulos para su cultivo. La regeneración *in vitro* de malanga es una alternativa para obtención de material vegetal sano libre de plagas y enfermedades (Deo *et al.*, 2009). La micropropagación de malanga ha sido reportada utilizando medio de cultivo semisólido (Jackson *et al.*, 1977; Yam *et al.*, 1990; Gómez *et al.*, 1991; Ko *et al.*, 2008; Manju *et al.*, 2017, Mancilla-Álvarez 2019). Sin embargo, a pesar de las ventajas que ofrece este método de regeneración de plantas, la micropropagación en medio de cultivo semisólidos implica altos costos de producción por la mano de obra, el uso de agentes gelificantes y dificulta la semiautomatización (Etienne y Berthouly, 2002; Georgiev *et al.*, 2014). Para superar estas limitaciones, nuevas metodologías han sido desarrolladas para la micropropagación de plantas, incluyendo los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT). Los SIT son biorreactores semiautomatizados diseñados para la propagación en masa de tejidos, embriones u órganos expuestos a un determinado volumen de medio líquido, tiempo específico y frecuencia de inmersión (Martínez-Estrada *et al.*, 2019). Estos sistemas contribuyen para reducir los costos de producción y aumentar el rendimiento biológico debido a que utilizan medio de cultivo líquido, aumentan las tasas de multiplicación y reducen la mano de obra mediante la semiautomatización de la micropropagación (Watt, 2012; Ekmekçigil *et al.* 2018). El éxito de la micropropagación en inmersión temporal está determinado en gran medida por el tiempo y frecuencia de inmersión y el volumen de medio de cultivo por explante.

Las técnicas de escalamiento por medio de la inmersión temporal es una alternativa para la micropropagación a escala comercial de varias especies (Aragón *et al.*, 2010; Welander *et al.*, 2014; Ramírez-Mosqueda *et al.*, 2016; Martínez-Estrada *et al.*, 2019). A la fecha, no se ha reportado el principio de la inmersión temporal para la micropropagación de malanga. Sin embargo, se han realizado estudios en cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*), una especie similar,

donde se evaluó la inmersión temporal pero no se determinó la frecuencia de inmersión ni el volumen de medio de cultivo por explante (Niemenak *et al.*, 2013). Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es establecer un protocolo eficiente para la multiplicación *in vitro* de malanga utilizando un sistema de escalamiento bajo el principio de la inmersión temporal.

## II. OBJETIVO GENERAL

Establecer un protocolo eficiente para la multiplicación *in vitro* de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) utilizando el biorreactor de inmersión temporal.

### 2.1 Objetivos particulares

- Comparar la eficiencia del cultivo en medio semisólido e inmersión temporal sobre la regeneración *in vitro* de malanga.
- Evaluar el efecto de diferentes frecuencias de inmersión en la formación *in vitro* de brotes adventicios en el BIT.
- Determinar la cantidad de medio de cultivo por explante en la formación *in vitro* de brotes adventicios en el BIT.
- Determinar el contenido de clorofila de los brotes *in vitro* de malanga en los diferentes sistemas de cultivo.
- Evaluar el porcentaje de supervivencia durante la aclimatización de las plantas de malanga obtenidas en los diferentes sistemas de cultivo.

### **III. HIPÓTESIS**

Los sistemas de inmersión temporal en medio de cultivo líquido incrementaran la tasa de multiplicación de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) durante la etapa de multiplicación *in vitro* en comparación del sistema de cultivo en medio semisólido.

## IV. MARCO TEÓRICO

### 1.-Importancia de la malanga

La malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott), es una planta tuberosa monocotiledónea, clasificada dentro de clase Liliatae y familia Araceae (Grimaldi *et al.*, 2018). El cultivo de malanga se originó en el Sudeste Asiático y se extiende hasta Australia y Papua Nueva Guinea. Sin embargo, también se cultiva en regiones con clima húmedo tropical o subtropical, como América Central y Sudamérica, Asia y África, siendo este último el mayor productor (Alcantara *et al.*, 2013; Grimaldi *et al.*, 2018). La malanga es el segundo cultivo de raíz más importante en términos de consumo, mientras que ocupa el cuarto lugar después de la batata, el ñame y la yuca en términos de su producción en peso, con un rendimiento anual estimado de más de 229,088 toneladas en todo el mundo (Singh *et al.*, 2012).

La malanga es una planta que está conformada por tallos y hojas, aunque el cormo es tradicionalmente la cuyo órgano de interés agronómico está en el cormo, el cual es un tallo subterráneo modificado que se desarrolla muy rápidamente, tomando una forma cilíndrica (Ubalua *et al.*, 2016). Una quinta parte del total de la biomasa que puede almacenar constituye materia seca, de la cual 80% son almidones de alta calidad digestiva para el hombre y algunas especies de interés zootécnico (Rodríguez, 2006). La malanga o sus productos no comercializables se pueden incorporar exitosamente a raciones balanceadas de alimento (Acosta, 1988) para peces, langostinos, bovinos, ovinos y porcinos (Olguín *et al.*, 1990, 1995), llegando incluso a substituir con ventajas al sorgo en raciones comerciales. Con la malanga se preparan numerosos productos como: refrescos, bebidas, sopas, pastas, guisos, ensaladas, dulces, panes, pasteles, galletas, nieve (Pereira *et al.*, 2018).

La industria de la malanga proporciona empleo a una gran cantidad de personas, principalmente en áreas rurales. Cuando se produce la exportación de taro, las instalaciones para limpiar, clasificar, empaquetar y enviar el taro proporcionan vías adicionales para el alivio de la pobreza y la generación de empleo en las áreas rurales. Por lo tanto, es dentro de la región de Asia / Pacífico que la malanga alcanza su mayor importancia en la tierra. Dentro de la región, es importante como proveedor de seguridad alimentaria, como foco de atención sociocultural, como cultivo comercial y fuente de divisas, y como vehículo para el desarrollo rural (Macharia *et al.*, 2014).

La exportación de la malanga no solo proporciona dinero en efectivo a los agricultores, sino también divisas valiosas para el país. En algunos países como Fiji, Tonga, Islas Cook, Tuvalu, Tailandia y Samoa han podido ganar sumas sustanciales del comercio de exportación de malanga, principalmente a Australia y Nueva Zelanda. Sin embargo, muchos otros países pueden participar en la exportación de taro, pero es necesario cumplir con las regulaciones de cuarentena las cuales disuaden de una u otra de las enfermedades y plagas del taro.

### **1.1.- Importancia socio cultural**

La malanga ocupa un lugar destacado en el folclore y las tradiciones orales de muchas culturas en Oceanía y el sudeste asiático. Se considera un cultivo de prestigio, y el cultivo de elección para la realeza, la entrega de regalos, el banquete tradicional y el cumplimiento de las obligaciones sociales (Onwueme, 1999).

El apego sociocultural a la malanga ha significado que se haya convertido en un tótem de identificación cultural. Las personas de origen de las islas del Pacífico continúan consumiendo malanga dondequiera que vivan en el mundo, no tanto porque no hay alimentos sustitutos, sino principalmente como un medio para mantener vínculos con su cultura. Este vínculo cultural con la malanga ha generado un lucrativo mercado de exportación para las etnias isleñas del Pacífico que viven en Australia, Nueva Zelanda y el oeste de América del Norte.

### **1.2.- Seguridad alimentaria**

En ciertas regiones tropicales del mundo la malanga ha sido un alimento tan importante para sus pobladores como podría serlo en otras el arroz (*Oryza sativa*) o el maíz (*Zea mays*). Tan importante es aún hoy para cierto sector de la población que en países como Cuba, República Dominicana y otros de El Caribe representa el primer alimento que las madres campesinas (de origen africano, mestizas o blancas) dan a sus pequeños como papilla después de la leche (Onwueme, 1999).



## **2.- La malanga en México**

En México la malanga es un cultivo no tradicional, por lo tanto, se produce en forma silvestre en zonas tropicales en las orillas de ríos, arroyos o lagunas (Álvarez-Ávila, 2013). Sin embargo, se produce de forma incipiente en Oaxaca, Veracruz y Puebla, que en conjunto conforman 100 hectáreas de las cuales se cosechan 2 mil 500 toneladas. Acorde con Mazariegos-Sánchez *et al*, (2017) el principal destino del producto cosechado, siendo el corno el de mayor importancia, es para la exportación hacia Estados Unidos y Canadá debido a la gran cantidad de inmigrantes de origen asiático, cuya demanda es de 30 mil toneladas anuales. Diversos estudios técnicos indican que la malanga es un cultivo rentable el cual tiene un costo de producción estimado de 45 mil pesos por hectárea, con una producción de 25 t ha<sup>-1</sup>. En el 2014, el precio pagado al productor fue de \$5.00 pesos MX por kilo, equivalente a \$125 mil pesos MX por hectárea, la rentabilidad de este producto es de \$2.77 pesos MX, lo cual indica que por cada peso invertido el productor gana \$1.77 pesos (Mazariegos-Sánchez *et al*, 2017).

A pesar de la escasa producción en México de la malanga, representan una oportunidad de ingreso económico para los campesinos. Es por esto que, en las últimas dos décadas, diversas instituciones han desarrollado acciones de investigación-desarrollo (I+D) en sus aspectos técnicos, sociales y económicos. Tal es el caso las aportaciones realizadas por Colegio de Postgraduados campus Veracruz, principalmente a través de autores como Olguín-Palacios y Álvarez-Ávila (2011), las cuales han tenido un impacto positivo en tierras bajas del municipio de Paso de Ovejas, Veracruz, así como las prácticas de difusión y capacitación necesarias para su adopción. El creciente desarrollo de este cultivo en la región veracruzana ha permitido mejorar el bienestar de muchas comunidades campesinas allí establecidas, elevando su nivel nutricional y económico, y contribuyendo además a la conservación de la base de recursos naturales de los agroecosistemas tropicales y a la disminución de la migración de pobladores rurales hacia los centros urbanos o al extranjero.

## **3.- Generalidades del cultivo**

La malanga es una planta herbácea, suculenta, y alcanza una altura de 1 a 3 metros, con un ciclo que consta de 9 meses (Onwueme, 1999; Ubalua et al., 2016). Prospera en climas cálido húmedos, con temperaturas que oscilan entre los 25 y 35 °C y a altitudes que van de los cero a mil metros

sobre el nivel del mar (msnm) (Gómez y Acero Duarte, 2002). Prefiere suelos sueltos limosos (con alto contenido de materia orgánica y con un pH de 5.5 a 6.5) y suelos arcillosos, pero si no hay disponibilidad de agua en la cosecha se dificulta la actividad; además tolera inundaciones, sobreviviendo hasta tres días bajo el agua; es una planta altamente demandante de agua, por lo que en el trópico seco debe cultivarse con riego (Onwueme, 1999; Ikezawa *et al.*, 2015).

El tallo central es elipsoidal, conocido como cormo. Las hojas nuevas salen enrolladas de entre los pecíolos (tronco de la planta) de las hojas ya formadas, y las laterales más viejas se marchitan y secan. La inflorescencia brota entre las hojas en espádice provistas de una espata (pequeño órgano de la planta) blanca de 12-15 centímetros (cm); con flores femeninas en su porción inferior, masculinas en la superior y estériles en la media (Onwueme, 1999).

Las partes comestibles de la malanga incluyen tallos y hojas, aunque los cormos son tradicionalmente la parte más consumida de esta planta en todo el mundo (Ooka y Brennan, 2000; Bose *et al.*, 2003). Esto debido a que proporciona múltiples nutrientes, como carbohidratos, proteínas, vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, vitaminas A y C), minerales (potasio, calcio, sodio, fósforo y hierro) y fibras (Kaur *et al.*, 2013; Subhash *et al.*, 2012; Temesgen y Retta, 2015). Este cultivo básico ofrece principalmente carbohidratos de alta calidad sin gluten (29% sobre bases de peso fresco), compuestos de gránulos de almidón pequeños y resistentes, lo que representa una liberación y absorción de glucosa controlada, lo que hace que sean altamente digestibles y un importante candidato adyuvante para reducir el riesgo de obesidad, diabetes, enfermedades cardíacas y ciertos tipos de cáncer (Kaushal *et al.*, 2015). Excepto por el contenido de tiamina y carbohidratos, las hojas de malanga exhiben niveles más altos de todos los otros nutrientes. Por otro lado, los tallos son pobres en estos nutrientes en comparación con los cormos, ofreciendo contenidos más altos solo para calcio, hierro y vitamina A, mientras que los otros nutrientes se encuentran principalmente en cantidades más pequeñas (Kaushal *et al.*, 2015).

Algunos cultivares de malanga muestran un alto contenido de oxalato, principalmente en las hojas, que pueden formar sales no absorbibles con cationes divalentes, como  $\text{Ca}_2^+$ ,  $\text{Fe}_2^+$  o  $\text{Mg}_2^+$ , y estos a su vez formar cristales (Du Thanh *et al.*, 2017). Los oxalatos insolubles, especialmente los de forma cristalizada pueden causar irritación e inflamación de la boca y la garganta. Los tratamientos térmicos, tales como hervir o cocinar (cormo, tallos o hojas) puede eliminar oxalatos, mediante la conversión de las sales en fases solubles (Kumoro *et al.*, 2014).

El cormo se puede cocer al vapor, freír, hornear o transformar en harina. La composición de la harina de malanga presenta altas concentraciones de ceniza y contenido de fibra cruda, comparable a otras harinas de cereales y vegetales, como la de papa, maíz y soya, haciendo de la harina de malanga una alternativa adecuada para la suplementación o sustitución de las harinas comerciales, tal es el caso de la harina de trigo. La suplementación de productos derivados del trigo con harina de malanga podría mejorar la calidad nutricional de los alimentos, ya que el trigo es pobre en aminoácidos esenciales. La incorporación de hasta un 10% de harina de malanga en la producción de pan de trigo/malanga afectó mínimamente las propiedades funcionales responsables de conferir las características del alimento y, por lo tanto, su aceptabilidad (Emmanuel *et al.*, 2010). La incorporación de harina de malanga produjo valores comparables para la densidad aparente y la capacidad de hinchamiento (harina sin blanquear), la mejora de la capacidad de gelificación y, aunque causó una disminución en la capacidad de absorción de agua y aceite, esto no fue suficiente para interferir en las características sensoriales del producto final. Además, la combinación harina de trigo/malanga en las formulaciones de pan aumenta las cantidades de ceniza, fibras crudas y carbohidratos del producto final (Ammar *et al.*, 2009).

La harina de malanga se puede usar en muchas preparaciones, como galletas, fideos, pasta, pan y formulaciones para bebés, que llegan no solo a consumidores habituales, sino también a aquellos que presentan restricciones dietéticas, como intolerancia al gluten o trastornos alérgicos alimentarios. También podrían ser una alternativa económica para los países en desarrollo que dependen de las importaciones de trigo, pero que presentan condiciones climáticas y de suelo adecuadas para el cultivo de malanga (Kaur *et al.*, 2013; Kaushal *et al.*, 2015; Noorfarahzilah *et al.*, 2014).

Bajo el término malanga existen dos géneros agrupados, sin embargo, existen diferencias: *Colocasia esculenta* (conocida como malanga, taro, hedeos, gabi) y *Xanthosoma* spp. (llamada quequisque, yautía, ocumo, macaba o tannia).

#### **4.- Propagación de la malanga**

La semilla o propágulo, se refiere al material vegetal que se utilizará para sembrar la malanga; en este caso pueden utilizarse dos partes de la planta, los cormos (camotes) o las plántulas nuevas (hijuelos), dependiendo de la disponibilidad de los materiales (Onwueme, 1999). Se puede cultivar

bajo diferentes sistemas de producción, que van desde asociaciones con otros cultivos (como frutales) (Miyoshi *et al.*, 1971; Murota *et al.*, 1984), o como monocultivo (sólo malanga). Estos métodos de propagación no siempre son adecuados debido a las grandes cantidades de semillas, el alto porcentaje de rotación de las semillas y la susceptibilidad al agente patológico (Manju *et al.*, 2017).

De acuerdo con Onwueme (1999) el cultivo presenta las siguientes limitaciones de alcance y de producción:

- i. *La enfermedad del tizón de la hoja del taro*: esta enfermedad excluye automáticamente el desarrollo de un comercio de exportación de taro en muchos países y, en algunos casos, amenaza el suministro interno de alimentos. La investigación debe continuar para desarrollar cultivares resistentes o para identificar medidas de control efectivas.
- ii. *El escarabajo del taro*: en la actualidad, esta es la plaga más grave del taro. Actualmente no hay una medida de control efectiva.
- iii. *Laboriedad del sistema de producción*: Incluso en los sistemas de producción de alta tecnología, como en Hawái, todavía se requiere mucho trabajo manual, especialmente para la cosecha.
- iv. *Escasez de material de siembra*: como la mayoría de los otros cultivos de raíces tropicales, el material de siembra para el taro es voluminoso, lo que hace que sea costoso transportarlo a largas distancias. También es perecedero, y no se puede almacenar durante mucho tiempo. El efecto neto de estos dos factores es que la disponibilidad de material de siembra es con frecuencia un factor limitante en la producción de la malanga. Dado que el material de siembra es tan escaso, se promueve que algunos agricultores utilicen cualquier material de siembra provocando la diseminación de cultivares portadores de enfermedades o de bajo rendimiento.
- v. *Manejo y comercialización posterior a la cosecha*: en la actualidad, la mayor parte del taro producido se maneja y comercializa como el cormo fresco. Por lo tanto, el procesamiento es una solución parcial para mejorar la seguridad alimentaria y, así, minimizar las pérdidas de cultivos (Kaushal *et al.*, 2015).
- vi. *Investigación y extensión limitadas de malanga*.

Debido a estas limitaciones es importante el desarrollo y/o aplicación de técnicas para la propagación y conservación de material vegetal de alta calidad fitosanitaria.

## **5.- Micropropagación**

Se conoce como micropropagación a la propagación asexual de plantas utilizando las técnicas *in vitro* de cultivo de tejidos (Pérez *et al.*, 1999), La micropropagación tiene como base el cultivo de células, tejidos y órganos provenientes de las plantas. Además, es una de las aplicaciones más utilizadas de entre todas las técnicas que componen la llamada biotecnología vegetal, ello se debe a su enorme productividad al comparársele con las técnicas tradicionales de propagación de plantas. Dentro de las principales ventajas que provee el uso de esta técnica es el desarrollo de un sistema de propagación clonal, independiente de las condiciones externas, con capacidad ilimitada de reproducción (dependiendo de la capacidad misma del laboratorio), reducción de espacio y tiempo, así como la obtención de plantas con calidad fitosanitaria (Hvoslef-Eide y Preil, 2005).

### **5.1.- Etapas de la micropropagación**

Acorde con Pérez *et al.* (1999), la micropropagación de cualquier especie vegetal está comprendida principalmente por cinco etapas las cuales son:

0. *Selección de la planta madre:* Consiste en selección y acondicionamiento de las plantas madre, planta elite con características deseables superiores al promedio que serán utilizadas para iniciar los cultivos *in vitro*.
1. *Establecimiento de cultivos axénicos:* se realiza la elección del explante (una semilla, un embrión aislado, un segmento de hoja, de tallo, de cotiledón, de raíz o de órganos reproductores, entre otros) el cual va a depender de la respuesta que se espera y de la especie. Posterior a la elección, el explante pasara por un proceso de desinfección, para después ser incubados en un medio estéril rico en nutrientes. En esta etapa es común encontrarse problemas mortalidad a causa de contaminación o incapacidad de adaptación a las nuevas condiciones.
2. *Multiplicación del tejido:* en esta etapa es donde se realiza la producción ilimitada de plantas. Existen tres vías para la multiplicación *in vitro*: la organogénesis, la

embriogénesis somática y la multiplicación por yemas, ápices o meristemos, de los cuales los dos primeros son más susceptibles a la generación de variantes en las plantas obtenidas, lo cual puede ser negativo en un esquema de propagación clonal.

3. *Elongación y enraizamiento*: El propósito de esta etapa es que los brotes formen su sistema radical y al mismo tiempo que se elonguen para facilitar su manipulación y hacer más probable su adaptación a las condiciones ambientales externas. La generación de raíz puede ser por medio de la aplicación de auxinas en el medio o con la aplicación directa de enraizador.
4. *Aclimatización o adaptación al medio externo*: Para una exitosa adaptación del explante al nuevo medio es necesario considerar algunas características fisiológicas que pudieron adaptar durante el cultivo *in vitro* las cuales pueden disminuir la eficiencia del sistema. Entre ellas se encuentra un pobre desarrollo de la cutícula y atrofio del mecanismo de cierre de estomas ocasionado por altos niveles de humedad relativa, falta de pigmentos fotosintéticos debido a la autotrofia de la planta durante el cultivo y falta de mecanismos de defensa ante agentes patógenos debido a la asepsia del medio. La adaptación de las plantas generadas *in vitro* a las condiciones externas es un factor determinante para la costeabilidad de un sistema de micropropagación, ya que de nada sirve un sistema de proliferación muy productivo, si el porcentaje de plantas que sobrevivirán a la adaptación es bajo.

Una característica de los sistemas es que no garantizan una eficiencia del 100% por consiguiente, la micropropagación también tiene desventajas que disminuyen su rentabilidad, dentro de las cuales se encuentra el uso de personal especializado y los elevados costos de producción (Etienne y Berthouly, 2002). Debido a esto en los últimos años, se han buscado alternativas que disminuyan estos problemas, lo cual ha llevado a incrementar el interés en el uso del sistema de medio líquido para la micropropagación comercial de brotes y embriones somáticos durante las diferentes etapas del ciclo de propagación. Además de la implementación de recipientes de cultivo cuyas características permiten un cierto grado de intercambio gaseoso en el ambiente que disminuyen la diferencia entre la humedad relativa interna y la externa, lo cual puede acortar el período de adaptación de las plantas en la fase de aclimatización. Una alternativa para la disminución de estas desventajas ha sido el desarrollo de los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT).

## **6.- Sistemas de Inmersión Temporal (SIT)**

El concepto básico de estos sistemas, de acuerdo con Georgiev *et al.*, (2014), se centra en lograr maximizar la producción de biomasa en plantas de manera económicamente viable, para aplicación directa o para el posterior aislamiento de productos de interés utilizando biorreactores.

Los biorreactores son equipos tecnológicos especializados, diseñados para el cultivo intensivo por regulación de diversos factores de carácter nutricional o físico (Afreen, 2006). Generalmente los sistemas de biorreactores consisten en un recipiente de cultivo, diseñado para el cultivo de los explantes o células en un ambiente aséptico donde se provea de nutrientes y un microambiente adecuado para un máximo crecimiento; y un bloque de control automático, el cual puede ser un sistema computarizado, totalmente automatizado o semi-automatizado. Los biorreactores se clasifican en tres clases principales: biorreactores en fase líquida en inmersión continua, biorreactores en fase gaseosa y Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) Georgiev *et al.*, (2014).

Los SIT son sistemas automatizados simples, diseñados para proporcionar un entorno óptimo, mejorar la absorción de nutrientes y transferencias de gases, además ayuda reducir el estrés mecánico teniendo como consecuencias la minimización de trastornos fisiológicos y preservar la integridad morfológica de los cultivos *in vitro* de plantas diferenciadas de rápido crecimiento. Los SIT proporcionan un ambiente natural para el cultivo *in vitro* de tejidos y órganos de plantas, donde los propágulos cultivados se sumergen periódicamente en un medio líquido y luego se exponen a un ambiente gaseoso (Steingroewer *et al.*, 2013).

Los SIT para la micropropagación de plantas han sido descrita y agrupada dentro de cuatro categorías de acuerdo al modo de operación: (1) máquinas de inclinación y balancines; (2) inmersión completa del material vegetal y renovación del medio de nutrientes; (3) inmersión parcial y mecanismos de renovación del medio de nutrientes; (4) inmersión completa por transferencia neumática del medio líquido y sin renovación del medio de nutrientes. Se han desarrollado diferentes tipos de SIT y se han aplicado ampliamente en la micropropagación comercial de diversas especies de plantas de importancia económica (Etienne y Berthouly, 2002; Afreen, 2006; Ducos *et al.*, 2009; Watt, 2012).

## 6.2.- Impacto de los SIT en la producción de plantas

La micropropagación en sistema semisólido es un proceso costoso, ya que la tecnología se basa en el manejo manual de un gran número de contenedores individuales (Afreen, 2006; Mordocco *et al.*, 2009). La mano de obra representa el 40–60% del costo final de las plantas propagadas, y la tecnología no está sujeta a automatización (Afreen, 2006; Etienne y Berthouly, 2002). Para superar esos aspectos negativos, los SIT semiautomatizados surgen como alternativa para reducir el componente de mano de obra e intensificar el cultivo utilizando medio de cultivo líquido en la propagación de las plantas.

En un intento por reducir los costos iniciales de inversión en equipos y ahorrar espacio y mano de obra, varios SIT se han desarrollado y distribuido en el mercado en los últimos años. Una característica que deben tener un SIT es el diseño simple y económico. En general un SIT debe ser fácil de manejar, compactos para almacenar, autoclavables y listos para múltiples usos. Algunas variantes desechables también están disponibles en la actualidad (Georgiev *et al.*, 2014).

Los SIT generalmente se construyen con recipientes de vidrio o plástico transparente, por lo que la luz de fuentes externas se puede usar para iluminar los materiales vegetales cultivados. Uno de los primeros SIT desarrollados es el sistema de frascos gemelos (Biorreactor de Inmersión Temporal [BIT]) (Escalona *et al.*, 1999; Lyam *et al.*, 2012; Watt, 2012).

Básicamente, el sistema BIT consiste en dos recipientes (matraces, botellas o frascos de boca ancha), conectados entre sí por un tubo en U (vidrio o plástico) o un tubo de silicona (Niemenak *et al.*, 2008; Aragón *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Sankar-Thomas y Lieberei, 2011; Schumann *et al.*, 2012; Scherer *et al.*, 2013). El contenedor del material vegetal puede o no estar equipado con material de soporte para explantes (pueden usarse cuentas de vidrio, espuma de poliuretano, tamices de metal o nylon) en su parte inferior (Sankar-Thomas *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Steinmacher *et al.*, 2011; Quiala *et al.*, 2012; Schumann *et al.*, 2012; Arencibia *et al.*, 2013). Cada contenedor está conectado a su propia línea de aire presurizado, controlada por dos relojes temporizadores independientes, junto con válvulas de solenoide de tres vías. El diseño simple y confiable hace que el sistema BIT sean favorables para muchos laboratorios. El sistema BIT se han aplicado con éxito en la propagación de plantas por semillas, brotes, grupos de nódulos y cultivos de embriones (Niemenak *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Steinmacher *et al.*, 2011; Quiala *et al.*, 2012; Scherer *et al.*, 2013).



## V. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Material Vegetal

Se utilizaron plantas de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) cv. Criolla provenientes del banco de germoplasma del Colegio de Postgraduados Campus Veracruz. Después de la recolección, los ejemplares (plantas madre) se mantuvieron bajo condiciones de invernadero durante 40 días a una irradiancia de  $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz natural, a  $30 \pm 2^\circ\text{C}$  y una humedad relativa de  $60 \pm 5\%$ . Se colectaron plantas jóvenes provenientes de las plantas madre, las cuales se le quitaron las raíces y las hojas. Posteriormente fueron transferidos al laboratorio donde se lavaron con jabón líquido comercial y agua corriente. Después fueron sumergidos en una solución que contenía  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of fungicida (Cupravit, Bayer, Leverkusen, DE) y  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  of bactericida (Agri-mycin, Pfizer, New York, EE) durante 20 min. Pasado el tiempo de desinfección las plantas se pasaron a campana de flujo laminar donde fueron flameados tres veces con alcohol al 70%. Después se procedió a extraer los meristemos apicales, los cuales fueron tratados con una solución de NaCl al 15% (v/v) y dos gotas de Tween 20 por cada 100 mL de solución durante 10 min, luego se realizaron 3 enjuagues con agua estéril, seguido de la inmersión de los meristemos en una solución de etanol al 70% durante 1 min y por último se enjuagaron con agua destilada.

Los meristemos extraídos se cultivaron en tubos de ensaye con 10 mL de medio de cultivo que contenían medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  sacarosa y  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP (6-Benzilaminopurina, Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA). El pH del medio de cultivo se ajustó a 5.7 con una solución de 0.1N de NaOH o 1N de HCl, posteriormente se adiciono 0.25% (w/v) de Phytigel® (Sigma-Aldrich Chemical Company, MO, USA) como agente gelificante. Al final, el medio de cultivo fue esterilizado a  $120^\circ\text{C}$  y 115 kPa durante 20 min. Los cultivos se incubaron a  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ , con un fotoperiodo de 16 h luz usando lámparas de luz blanca con una densidad fotosintética de flujos de fotones de  $40\text{-}50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

## **5.2 Evaluación de los diferentes sistemas de cultivo**

Después de tres subcultivos (cada 30 días) en las condiciones de cultivo descritas anteriormente, se utilizaron los brotes regenerados para la evaluación de los dos sistemas de cultivo: medio semisólido y medio líquido usando el Biorreactor de Inmersión Temporal (BIT) descrito por Escalona *et al.* (1999). En los dos sistemas la composición del medio de cultivo fue con el uso de medio MS suplementado con  $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  sacarosa y  $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de BAP, el cual se usó sin agente gelificante para el caso de SIT. Las condiciones de preparación de medio de cultivo fueron las mismas descritas anteriormente. Para ambos sistemas se utilizaron frascos de 1 L de capacidad, cada uno con 10 explantes culture. Se consideró un explante a un ejemplar de dos brotes con 1 cm de longitud. En el caso del BIT, se utilizaron 500 mL de medio líquido, con un volumen de 50 mL de medio por explante con una frecuencia de inmersión de 2 min. Posteriormente la frecuencia de inmersión fue de 2 min cada 4 h. Se realizaron tres repeticiones y las condiciones de incubación fueron las mismas descritas anteriormente.

## **5.3 Evaluación de la frecuencia de inmersión**

Para la determinación de la frecuencia de inmersión apropiada para la multiplicación *in vitro* de malanga se evaluaron tres frecuencias: dos minutos cada 4, 8 y 12 h. En todos los ensayos, se utilizaron 10 explantes con 50 mL de medio de cultivo por explante por biorreactores y se usaron tres biorreactores por frecuencia evaluada. La composición del medio de cultivo y las condiciones de incubación en todos los tratamientos son las mismas que las descritas en los experimentos previos, pero sin agente gelificante.

## **5.4 Efecto del volumen de medio de cultivo por explante**

Después de determinar cuál es la mejor frecuencia de inmersión se evaluó el efecto del medio de cultivo por explante. Los volúmenes que se evaluaron fueron 25, 50 y 100 mL por explante con una frecuencia de inmersión de 2 min cada 4 h. En todos los tratamientos se utilizaron tres biorreactores con 500 mL de medio cada uno, inoculándose con el número correspondiente de explantes. El medio de cultivo líquido y las condiciones de cultivo fueron las mismas descritas anteriormente.

## 5.5 Contenido de clorofila

Se determinó el contenido de clorofila a, b y total de acuerdo por la metodología propuesta por Harborne (1973), con ligeras modificaciones de acuerdo con lo descrito por Martínez-Estrada *et al.*, (2019). Las absorbancias fueron medidas a través de un espectrofotómetro (Genesys 10S, Thermo Scientific, MA, USA) a longitudes de onda de 645 y 663 nm. Posteriormente, se realizó el cálculo de clorofila por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\text{Chl a (C)} = \frac{[(12.7 * A_{663}) - (2.59 * A_{645})](V)}{(1000 * P)}$$

$$\text{Chl b (C)} = \frac{[(22.9 * A_{645}) - (4.70 * A_{663})](V)}{(1000 * P)}$$

$$\text{Chl Total (C)} = \frac{[(8.20 * A_{663}) - (20.2 * A_{645})](V)}{(1000 * P)}$$

Chl = Clorofila

A = Absorbancia

C = Concentración (mg g<sup>-1</sup> PF)

V = Volumen de graduación (mL)

P = Peso de la muestra (g)

1000= Factor conversión

## 5.6 Aclimatización *ex vitro*

Para evaluar los efectos entre los sistemas de cultivo durante la aclimatización se utilizaron 100 vitroplantas de malanga con una longitud de entre 1.5 a 2.5 cm de los diferentes sistemas de cultivo, las cuales se cultivaron *ex vitro* en semilleros de 72 cavidades con sustrato de turba, suelo y agrolita (1:1:1). Después de 30 días, las vitroplantas fueron trasplantadas a semilleros de 38 cavidades. Las plantas se mantuvieron bajo condiciones de invernadero en un área con malla sombra al 60% a

$30 \pm 2^\circ\text{C}$ , con una humedad relativa de  $60 \pm 5\%$  y una irradiancia de  $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  de luz natural.

### **5.7 Diseño experimental y análisis de datos**

Se realizó un diseño completamente al azar para todos los experimentos, con tres repeticiones. En todos los tratamientos *in vitro* se evaluaron las variables de número y longitud de brotes, número de hojas y contenido de clorofila, después de 30 días de cultivo. Para evaluar la eficiencia de los sistemas de micropropagación se realizó una prueba de T de Student's. Para evaluar la frecuencia de inmersión y el volumen de medio de cultivo por explante, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) a través del programa SPSS statistical software (versión 22 para Windows). Para la aclimatización, se evaluó el porcentaje (%) de supervivencia después de 30 días.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Evaluación de los diferentes sistemas de cultivo

Los resultados mostraron diferencias significativas en las variables evaluadas durante la multiplicación *in vitro* de malanga utilizando diferentes sistemas de cultivo (Cuadro 1). La mayor tasa de multiplicación se obtuvo en inmersión temporal, con  $15.80 \pm 0.46$  brotes por explante, mientras que la menor formación de brotes se obtuvo en medio semisólido, con  $5.90 \pm 0.29$  brotes por explante. Respecto a la longitud de brotes, los brotes obtenidos en inmersión temporal obtuvieron mayor longitud, con  $4.39 \pm 0.21$  cm en comparación con el medio semisólido, con  $2.91 \pm 0.17$  cm de altura. Para la variable número de hojas por brote, en inmersión temporal se obtuvieron  $3.88 \pm 0.14$  hojas por brote, mientras que en semisólido se generaron sólo  $2.45 \pm 0.09$  hojas por brote.

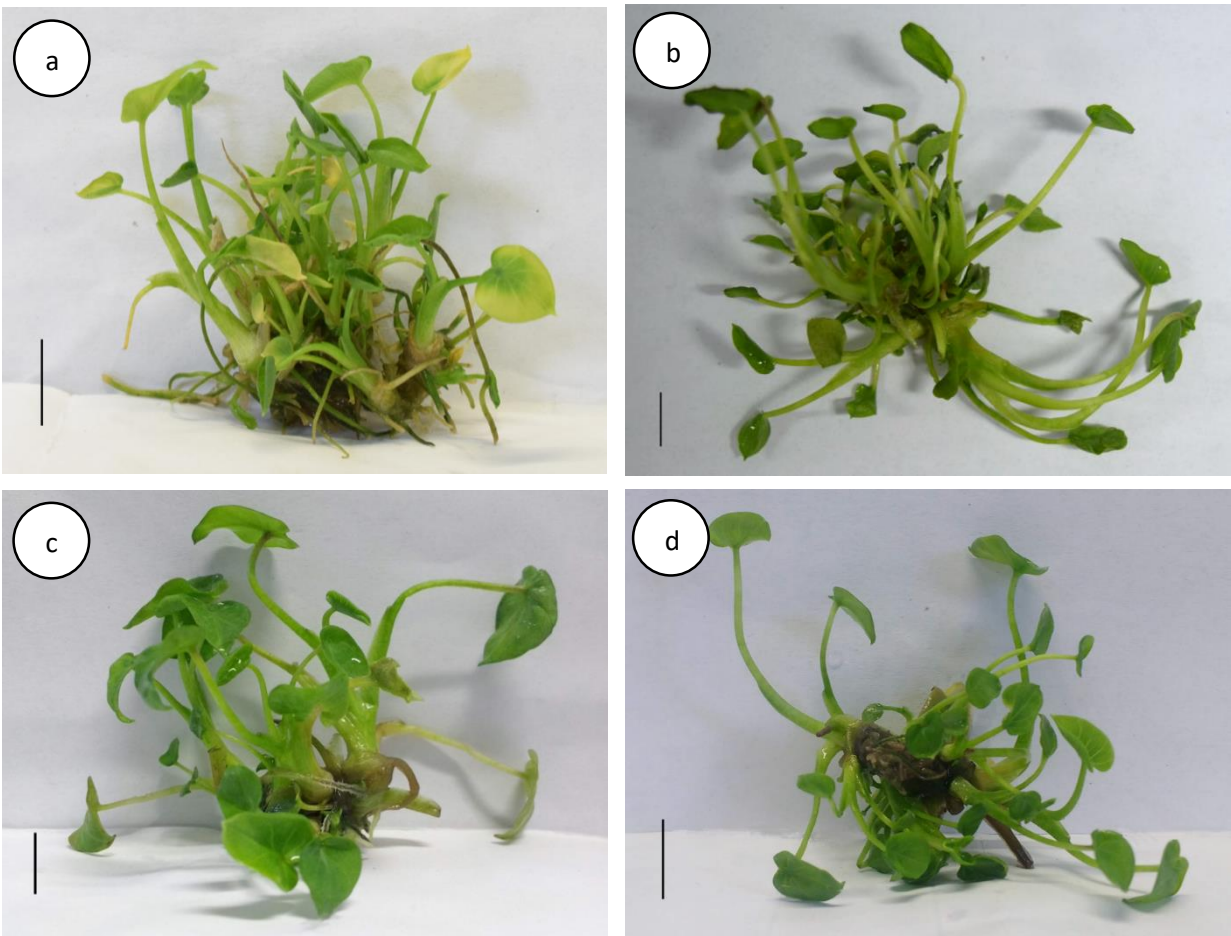
**Cuadro 1.** Efecto del sistema de cultivo, frecuencia de inmersión y volumen de medio por explante sobre la multiplicación *in vitro* de malanga (*Colocasia esculenta*) en BIT.

| Sistema de micropropagación        | Núm. de brotes por explante | Longitud de brotes (cm) | Núm. de hojas por brote |
|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Semisólido                         | $5.90 \pm .29^c$            | $2.91 \pm .17^b$        | $2.45 \pm .14^{bc}$     |
| Inmersión temporal                 | $15.80 \pm .46^a$           | $4.39 \pm .21^a$        | $3.88 \pm .09^a$        |
| Frecuencia de inmersión en SIT     |                             |                         |                         |
| Frecuencia cada 4 h                | $15.80 \pm .46^a$           | $4.39 \pm .21^a$        | $3.88 \pm .09^a$        |
| Frecuencia cada 8 h                | $11.90 \pm .45^b$           | $3.41 \pm .14^b$        | $2.73 \pm .14^b$        |
| Frecuencia cada 12 h               | $10.33 \pm .44^b$           | $3.19 \pm .11^b$        | $2.21 \pm .14^c$        |
| Volumen de medio por explante (ml) |                             |                         |                         |
| 25                                 | $15.32 \pm .53^a$           | $4.71 \pm .20^a$        | $2.74 \pm .73^b$        |
| 50                                 | $15.80 \pm .46^a$           | $4.39 \pm .21^a$        | $3.88 \pm .79^b$        |
| 100                                | $11.43 \pm .49^b$           | $3.25 \pm .13^b$        | $3.78 \pm .75^a$        |

Los valores representan la media  $\pm$  ES (error estándar). Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Las diferencias obtenidas entre el sistema de cultivo en medio semisólido e inmersión temporal demuestran que la inmersión temporal tiene mayor efecto en la multiplicación y desarrollo de brotes en malanga, llegando a obtener casi tres veces más brotes por explante en inmersión

temporal respecto a medio semisólido. En otros estudios se ha demostrado también que los sistemas de inmersión temporal aumentan considerablemente la tasa de multiplicación de brotes respecto al medio semisólido. González *et al.*, 2011 en Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) aumentaron dos veces más el número de brotes en IT respecto al medio semisólido. Por otro lado, Ramos-Castellá *et al.*, 2014 en vainilla (*Vanilla planifolia*) la tasa de multiplicación en IT fue de 14.27 brotes por explante en comparación a 5.80 brotes por explantes obtenidos en medio semisólido. Vives *et al.*, 2017 en estevia (*Stevia rebaudiana* cv. Morita II) observaron un incremento de siete veces más en la tasa de multiplicación en inmersión temporal respecto al medio semisólido. Más recientemente, Regueira *et al.* (2018) en mimbrera blanca (*Salix viminalis*) cultivado IT obtuvieron mayor coeficiente de multiplicación respecto al medio al medio semisólido. De acuerdo a Etienne y Berthouly (2002) y Georgiev *et al.* (2014), el aumento en la tasa de multiplicación de explantes y desarrollo de brotes se debe a factores como: a la renovación de aire dentro del recipiente de cultivo y el al contacto superficial del medio líquido con los explantes.



**Figura 1.** Efecto del Sistema de cultivo y frecuencias de inmersión en SIT en la multiplicación *in vitro* de malanga. a) medio semisólido, b-e) inmersión temporal durante 2 min cada 4, 8 y 12 h respectivamente. Barra =1 cm.

## 6.2 Evaluación de la frecuencia de inmersión

Al evaluar diferentes frecuencias de inmersión se encontraron diferencias significativas en las variables morfológicas evaluadas (Figura 1). La frecuencia con mayor producción de brotes fue cada 4 h, con  $15.80 \pm 0.46$  brotes por explante, seguido de 8 y 12 h, con  $11.90 \pm 0.45$  y  $10.33 \pm 0.44$  brotes por explante, respectivamente. Respecto a la longitud de brotes, la mayor longitud se encontró en la frecuencia de cada 4 h, con  $4.39 \pm 0.21$ , mientras que la menor longitud se encontró en las frecuencias de 8 y 12 h, con una longitud de brotes de  $3.41 \pm 0.14$  y  $3.19 \pm 0.11$  cm de altura, respectivamente. En relación al número de hojas por brote, el mayor número de hojas se obtuvo en la frecuencia de cada 4 h, con  $3.88 \pm 0.09$  hojas; mientras que, la menor formación de hojas

ocurrió en las frecuencias cada 8 y 12 h, con  $2.73 \pm 0.14$  y  $2.21 \pm 0.14$  hojas por explante, respectivamente.

La determinación de la frecuencia de inmersión es importante durante el proceso de escalamiento durante la micropropagación comercial de plantas. En nuestro estudio, se observó que una menor frecuencia de inmersión (cada 4 h) promueve la formación y crecimiento de brotes; mientras que, en las mayores frecuencias de inmersión evaluadas (cada 8 y 12 h) se reduce el desarrollo de brotes. Este comportamiento puede ser debido a que la malanga es una planta semiacuática (Macharia *et al.*, 2014), por lo tanto demandan una mayor cantidad de agua para un óptimo desarrollo. De acuerdo con Ikezawa *et al.* (2015), el cultivo de malanga bajo condiciones controladas de inundaciones aumenta los rendimientos de producción sobre la producción normal en tierra seca.

Los resultados obtenidos concuerdan con los obtenidos por Ekmekçigil *et al.* (2019) en los cuales obtuvieron una mayor regeneración de brotes de cattleya (*Cattleya forbesii* Lindl) con una frecuencia de inmersión cada 4 h durante, la cual fue mayor a la que se obtuvo en medio semisólido. Niemenak *et al.*, (2013) en cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) aumentaron la regeneración de brotes en una frecuencia de inmersión cada 6 h.

### **6.3 Efecto del volumen de medio de cultivo por explante**

Al evaluar la cantidad de medio de cultivo por explante se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Figura 2). El mayor número de brotes por explante se obtuvo en los volúmenes de 25 y 50 ml de medio de cultivo por explante, con  $15.32 \pm 0.53$  y  $15.80 \pm 0.46$  brotes, respectivamente, mientras que con un volumen de 100 ml de medio de cultivo se obtuvo la menor producción de brotes, con  $11.43 \pm 0.49$  brotes por explante. Respecto a la longitud de brote se observó una mayor altura en los tratamientos de 25 mL y 50 mL, obteniendo brotes de  $4.71 \pm 0.20$  y  $4.39 \pm 0.21$  cm de longitud, respectivamente. Para la variable número de hojas, la mayor formación de hojas ocurrió en 50 y 100 mL de medio de cultivo por explante, obteniendo  $3.88 \pm 0.79$  y  $3.78 \pm 0.75$  hojas por explante, respectivamente; mientras que, la menor formación de hojas ocurrió en un volumen de 25 ml, obteniendo  $2.74 \pm 0.73$  hojas por brote.



En los sistemas de inmersión temporal, la cantidad de medio por explante es un factor que afecta el desarrollo de las plantas. Nuestros resultados indican que la adición de 25 o 50 mL de medio de cultivo por explante favorecieron el número de brotes por explante, longitud y número de hojas por brote; mientras que, con un volumen de 100 ml por explante ocurrió una disminución en las variables evaluadas. Este comportamiento se debe probablemente a que mayor volumen de medio podría diluir componentes promotores de crecimiento excretados por los explantes (Etienne y Berthouly, 2002; Ramos-Castellá *et al.* 2014).

Resultados similares fueron obtenidos por Lorenzo *et al.* (1998) en caña de azúcar (cv. C-1051-73, donde 50 mL de medio de cultivo por explante promovieron la tasa de multiplicación en comparación con 72.5 y 95 ml de medio de cultivo por explante. Por otro lado, Ramos-Castellá *et al.*, (2014) en vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) con un volumen de 25, 33.3 o 50 mL de medio de cultivo por explante, no se encontraron diferencias significativas durante el desarrollo de brotes. Este mismo efecto fue observado por Martínez-Estrada *et al.* (2019) en anturio (*Anthurium andreanum* cv. Rosa) donde no reportaron diferencias significativas entre los volúmenes 25, 37.5 y 50 ml de medio de cultivo por explante; sin embargo, determinaron que 25 mL fue el volumen adecuado para reducir costos de producción.



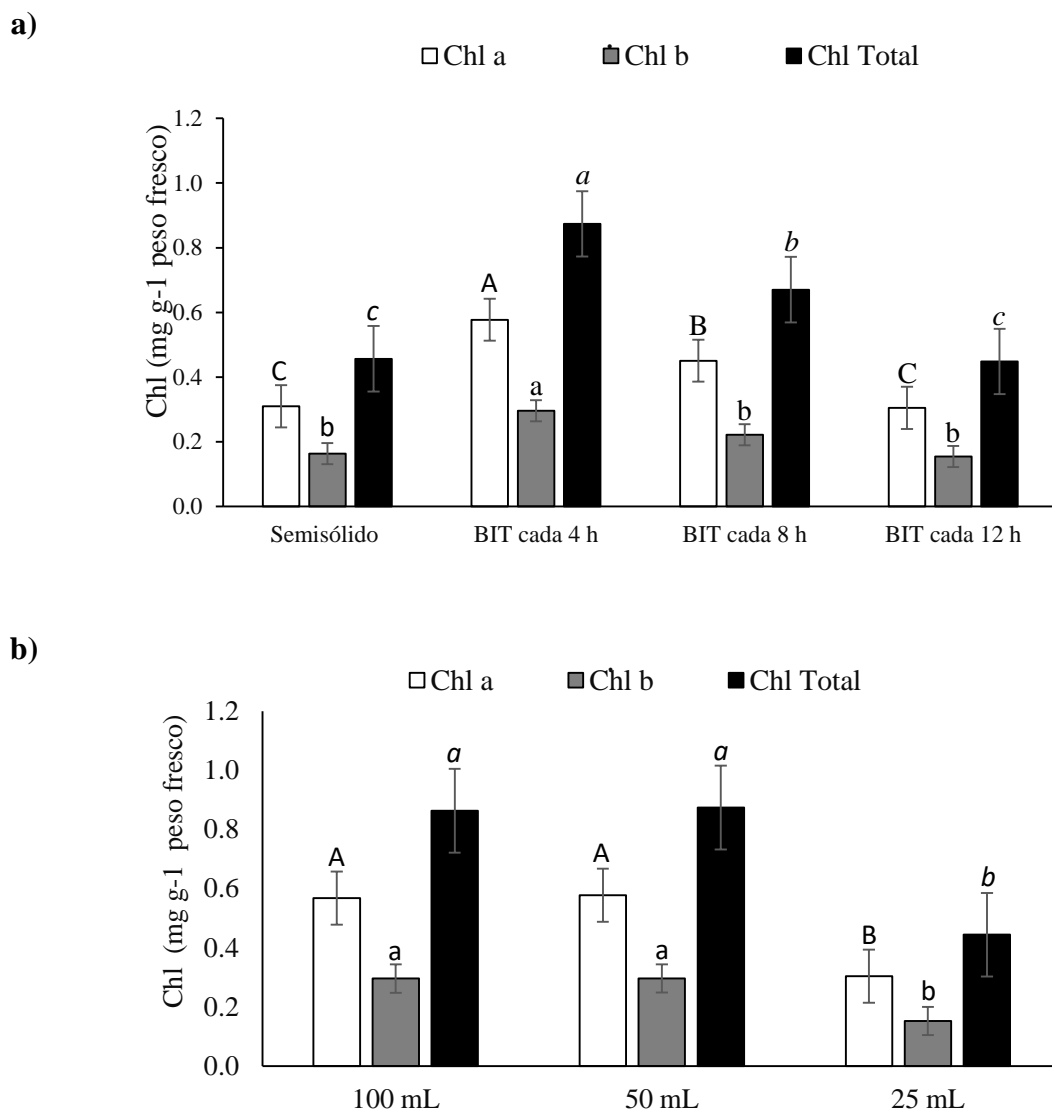
**Figura 2.** Efecto del volumen de medio de cultivo por explante en la etapa de multiplicación *in vitro* de malanga. Inmersión Temporal durante 2 min cada 4 h con a) 100 mL, b) 50 mL y c) 25 mL por explante. Barra=1 cm.

#### 6.4 Contenido de clorofila

Los resultados mostraron diferencias significativas para el contenido de clorofila entre los sistemas de cultivo evaluados y los diferentes volúmenes de medio de cultivo por explante (Figura 3). Para los sistemas de cultivo evaluados, los mayores contenidos de clorofila a, b y total se obtuvieron en inmersión temporal con frecuencia de inmersión cada 4 horas, seguido de la frecuencia de inmersión cada 8 h; mientras que, los menores contenidos se muestran en medio semisólido e inmersión temporal con una frecuencia de inmersión cada 12 h (Figura 3a). En relación al volumen de medio de cultivo por explante, los resultados obtenidos mostraron mayor contenido de clorofila a, b y total en los tratamientos de 50 y 100 mL de medio de cultivo por explante, mientras que, el menor contenido de clorofila se obtuvo en un volumen de 25 mL de medio de cultivo por explante (Figura 3b).

Los brotes obtenidos en las menores frecuencias de inmersión (cada 4 y 8 h) mostraron los mayores contenidos de clorofila, mientras que, en medio semisólido y la mayor frecuencia de inmersión evaluada (cada 12 h) mostraron el menor contenido de clorofila. Este hecho se debió a que probablemente los explantes con menor frecuencia de inmersión están expuestos a mayor disponibilidad de nutrientes que forman parte de la molécula de clorofila, como son el nitrógeno y magnesio. Respecto a la determinación de volumen de medio por explante, se observó una menor cantidad de pigmentos fotosintéticos en el tratamiento de 25 mL de medio de cultivo por explante. Este efecto podría explicarse a que en un menor volumen de medio de cultivo existe menor disponibilidad y consumo de nutrientes que conforman la molécula de clorofila. Por otro lado, de acuerdo a Roels *et al.*, 2006 y Aragón *et al.*, 2010, mencionan que el intercambio de aire que ocurre durante la inmersión temporal puede ser el causante de la mejora en la actividad fotosintética. Esto debido a que el uso de TI permite un mayor flujo de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, promoviendo a las plantas *in vitro* mejorar su capacidad mixotrófica.

El incremento en el contenido de clorofila en inmersión temporal ha sido reportado por Jova *et al.* (2011) en ñame (*Dioscorea alata* L. 'Pacala Duclos'); Martínez-Estrada *et al.* (2019) en anturio (*Anthurium andreanum* cv. Rosa) y Bello-Bello *et al.* (2019) en banano (*Musa* AAA cv. Grand Naine).



**Figura 3.** Contenidos de clorofila durante la etapa multiplicación de malanga después de 30 días de cultivo *in vitro*. Efecto de a) Sistema de cultivo y b) volumen de medio por explante. Barras representan la media  $\pm$  el error estándar. Barras seguidas por diferentes letras denotan diferencias significativas estadísticamente (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). BIT: Biorreactor de Inmersión Temporal. Chl: Clorofila.

## 6.5 Aclimatización *ex vitro*

Al evaluar el porcentaje de sobrevivencia *ex vitro* durante la aclimatización, no se encontraron diferencias entre los sistemas de cultivo, frecuencias de inmersión y los diferentes volúmenes de medio de cultivo por explante evaluados. Esto debido a que en todos los tratamientos el porcentaje de supervivencia fue entre 98-100%. La Figura 4 muestra las vitroplantas obtenidas a los 30 y 60 días de cultivo bajo condiciones de invernadero.

La alta sobrevivencia de las vitroplantas durante la aclimatización garantiza el éxito del proceso de micropropagación. En nuestro estudio, a pesar de que la mayoría de los brotes de malanga con escaso sistema radicular, estos presentaron altos porcentajes de sobrevivencia en todos los tratamientos evaluados. Al respecto, Etienne y Berthouly (2002) y Debnath (2017) mencionan que al utilizar la IT como técnica para la micropropagación, se observa una mayor tasa de sobrevivencia durante la aclimatización debido al endurecimiento de las plantas *in vitro* ocasionado por actividad mixotrófica. Al utilizar la IT como técnica de micropropagación, Flores-Mora *et al.*, (2015) en quince (*Cydonia oblonga*), obtuvieron 80% de supervivencia. Gomes *et al.*, 2016 en palma de aceite (*Elaeis guineensis*), reportan 82% de supervivencia; mientras que, Ahmadian *et al.*, (2017) en carnation (*Dianthus caryophyllus* L.), lograron el 90% de supervivencia.

En este trabajo, los altos porcentajes de sobrevivencia (98-100%) se debió probablemente a que la malanga cv. Criolla es una especie que no demanda manejo especial durante el proceso de aclimatización ya sea en el sistema de cultivo en medio líquido o en inmersión temporal. Aunado a ello, las adecuadas condiciones de aclimatización y fertilización aquí descritas contribuyeron a la obtención de resultados favorables durante la aclimatización *ex vitro*.

En conclusión, se determinó que el BIT con menor frecuencia de inmersión y una reducida cantidad de medio de cultivo por explante, promueven la tasa de multiplicación y crecimiento de brotes en comparación con el medio semisólido. El protocolo descrito en este trabajo, es una alternativa para la micropropagación a escala comercial de malanga.



**Figura 4.** Plántulas aclimatizadas de malanga obtenidas de BIT a los 30 días de cultivo *ex vitro* bajo condiciones de invernadero.

## VII. CONCLUSIONES

- Las diferencias obtenidas en este estudio entre el sistema de cultivo en medio semisólido e inmersión temporal demuestran que la inmersión temporal tiene mayor efecto en el desarrollo de brotes en malanga, obteniendo casi tres veces más brotes por explante en inmersión temporal.
- Se observó que una menor frecuencia de inmersión promueve la formación y crecimiento de brotes; mientras que, en las mayores frecuencias de inmersión evaluadas se reduce el desarrollo de brotes.
- Se observó que una menor cantidad de medio de cultivo por explante (25 y 50 mL) promueve el desarrollo de brotes; mientras que, a mayor volumen (100 mL) lo disminuye.
- Los brotes obtenidos en las menores frecuencias de inmersión (cada 4 y 8 h) mostraron los mayores contenidos de clorofila, mientras que, en medio semisólido y la mayor frecuencia de inmersión evaluada (cada 12 h) mostraron el menor contenido de clorofila.
- Los altos porcentajes de sobrevivencia (98-100%) durante la aclimatización, se debió probablemente a que la malanga cv. Criolla es una especie que no demanda manejo especial ya sea en el sistema de cultivo en medio líquido o en inmersión temporal.
- Se reporta por primera vez un protocolo para la micropropagación de malanga en inmersión temporal.

## VII. LITERATURA CITADA

- Acosta B.R. (1988). Viabilidad Técnico-económica de la malanga [*Colocasia esculenta* (L) Schott] en la formulación de raciones balanceadas para alimentación de cerdos. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Economía Agrícola. Colegio de Postgraduados.
- Afreen, F. (2006). Temporary immersion bioreactor, in: Gupta, S. D., Ibaraki, Y. (Eds.), *Plan Tissue Culture Engineering*, Springer Netherlands, pp. 187-201.
- Ahmadian, M., Babaei, A., Shokri, S., & Hessami, S. (2017). Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 309-315.
- Alcantara, R. M., Hurtada, W. A., & Dizon, E. I. (2013). The nutritional value and phytochemical components of taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] powder and its selected processed foods. *Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(3), 1–7.
- Álvarez-Ávila, M. (2013). Malanga y espinaca de agua podrían mejorar la dieta nutricional. Agroentorno.
- Ammar, M., Hegazy, A., & Bedeir, S. (2009). Using of taro flour as partial substitute of wheat flour in bread making. *World Journal of Dairy Food Sciences*, 4(2), 94–99.
- Aragón, C.E., Escalona, M., Rodriguez, R., Cañal, M.J., Capote, I., Pina, D., González- Olmedo, J. (2010). Effect of sucrose, light, and carbon dioxide on plantain micropropagation in temporary immersion bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 46, 89–94.
- Arencibia, A. D., Vergara, C., Quiroz, K., Carrasco, B., Bravo, C., & Garcia-Gonzales, R. (2013). An approach for micropropagation of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) plants mediated by temporary immersion bioreactors (TIBs). *American Journal of Plant Sciences*, 4(05), 1022.
- Bello-Bello, J. J., Cruz-Cruz, C. A., & Pérez-Guerra, J. C. (2019). A new temporary immersion system for commercial micropropagation of banana (*Musa AAA* cv. Grand Naine). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-8.
- Bose TK, Kabir J, Maity TK, Parthasarathy Som MG (2003). *Vegetable crops*, Naya Udyog Publishers, Kolkata. 2:413-442.
- Debnath, S. C. (2017). Temporary immersion and stationary bioreactors for mass propagation of true-to-type highbush, half-high, and hybrid blueberries (*Vaccinium* spp.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 92(1), 72-80.
- Deo, P. C., Tyagi, A. P., Taylor, M., Becker, D. K., & Harding, R. M. (2009). Improving taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta*) production using biotechnological approaches. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 27(1), 6-13.

- Du Thanh, H., Phan Vu, H., Vu Van, H., Le Duc, N., Le Minh, T., & Savage, G. (2017). Oxalate content of taro leaves grown in Central Vietnam. *Foods*, 6(2), 1–7.
- Ducos JP., Terrier B., Courtois D. (2009) Disposable Bioreactors for Plant Micropropagation and Mass Plant Cell Culture. In: Eibl R., Eibl D. (eds) Disposable Bioreactors. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, vol 115. Springer, Berlin, Heidelberg pp. 89-115.
- Ekmekçigil, M., Bayraktar, M., Akkuş, Ö., & Gürel, A. (2019). High-frequency protocorm-like bodies and shoot regeneration through a combination of thin cell layer and RITA® temporary immersion bioreactor in *Cattleya forbesii* Lindl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136(3), 451-464.
- Emmanuel, C. I., Osuchukwu, N., & Oshiele, L. (2010). Functional and sensory properties of wheat (*Aestium triticium*) and taro flour (*Colocasia esculenta*) composite bread. *African Journal of Food Science*, 4(5), 248–253.
- Escalona, M., Lorenzo, J. C., González, B., Daquinta, M., González, J. L., Desjardins, Y., & Borroto, C. G. (1999). Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports*, 18(9), 743-748.
- Etienne, H., & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231.
- Flores-Mora, D. M., Chacón-Cerdas, R., Alvarado-Marchena, L., Schmidt-Durán, A., & Alvarado-Ulloa, C. (2015). Enraizamiento de vitroplantas de membrillo (*Cydonia oblonga*) por medio de inmersión temporal automatizada y su aclimatación.
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., & Bley, T. (2014). Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in life sciences*, 14(6), 607-621.
- Gomes, H. T., Bartos, P. M. C., Balzon, T. A., & Scherwinski-Pereira, J. E. (2016). Regeneration of somatic embryos of oil palm (*Elaeis guineensis*) using temporary immersion bioreactors. *Industrial Crops and Products*, 89, 244-249.
- Gómez, L., Saborío, F., Salazar, I., Arias, O., & Thorpe, T. (1991). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de cuatro genotipos de ñampi (*Colocasia esculenta* var *antiquorum*). *Agronomía costarricense*, 15, 123-128.
- Gómez, M. E. & Acero Duarte, L.E (2002). Guía para el cultivo y aprovechamiento del bore: *Alocasia macrorrhiza* (Linneo) Schott (Vol. 101). Convenio Andrés Bello.
- González, R., Ríos, D., Avilés, F., & Sánchez-Olate, M. (2011). Multiplicación *in vitro* de *Eucalyptus globulus* mediante sistema de inmersión temporal. *Bosque (Valdivia)*, 32(2), 147-154.
- Grimaldi, I. M., Muthukumaran, S., Tozzi, G., Nastasi, A., Boivin, N., Matthews, P. J., & van Andel, T. (2018). Literary evidence for taro in the ancient Mediterranean: A chronology of names and uses in a multilingual world. *PloS one*, 13(6), e0198333.
- Harborne, J.B., (1973). Nitrogen compounds. *Phytochemical Methods*. Springer, The Netherlands, pp. 166–211.



- Hvoslef-Eide, A. K., & Preil, W. (Eds.). (2005). Liquid culture systems for *in vitro* plant propagation. Springer Science & Business Media.
- Ikezawa, K., Onjo, M., Yoshida, R., Yamamoto, M., & Iwai, S. (2015). Effects of flooding on photosynthesis in eddo. *Japan. Journal Crop Science*, 84 (2), 160-164.
- Jackson, G. V. H., Ball, E. A., & Arditti, J. (1977). Tissue culture of taro, *Colocasia esculenta* (L.) Schott. *Journal of Horticultural Science*, 52(3), 373-382.
- Jova, M. C., Kosky, R. G., & Cuellar, E. E. (2011). Effect of liquid media culture systems on yam plant growth (*Dioscorea alata* L. 'Pacala Duclos'). *BASE*. 15(4), 515-521.
- Kaur, M., Kaushal, P., & Sandhu, K. S. (2013). Studies on physicochemical and pasting properties of taro (*Colocasia esculenta* L.) flour in comparison with a cereal, tuber and legume flour. *Journal of Food Science and Technology*, 50(1), 94–100.
- Kaushal P, Kumar V, Sharma HK. (2015). Utilization of taro (*Colocasia esculenta*): a review. *Journal of Food Science and Technology*. 52(1), 27–40.
- Ko, C., Kung, J., & Mc Donald, R. (2008). *In vitro* micropropagation of white dasheen (*Colocassia esculenta*). *African Journal of Biotechnology*, 7(1).
- Kumoro, A. C., Putri, R. D. A., Budiyati, C. S., & Retnowati, D. S. (2014). Kinetics of calcium oxalate reduction in taro (*Colocasia esculenta*) corm chips during treatments using baking soda solution. *Procedia Chemistry*, 9, 102–112.
- Liu, L., Li, S., Yu, K., Tang, H., Liu, H., Dan, M., & Lu, M. (2010). Rapid propagation of virus-free sugarcane plantlets via temporary immersion bioreactor system. *Agricultural Science & Technology-Hunan*, 11(5), 148-190.
- Lorenzo, J. C., González, B. L., Escalona, M., Teisson, C., & Borroto, C. (1998). Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 54(3), 197-200.
- Lyam, P. T., Musa, M. L., Jamaledine, Z. O., Okere, U. A., & Odojin, W. T. (2012). The potential of temporary immersion bioreactors (TIBs) in meeting crop production demand in Nigeria. *Journal of biology and life science*, 3(1), 66-86.
- Macharia, M. W., Runo, S. M., Muchugi, A. N., & Palapala, V. (2014). Genetic structure and diversity of East African taro [*Colocasia esculenta* (L.) Schott]. *African Journal of Biotechnology*, 13(29).
- Mancilla-Álvarez, E., Ramírez-Mosqueda, M. A., Arano-Avalos, S., Núñez-Pastrana, R., and Bello-Bello, J. J. (2019). *In Vitro* Techniques to the Conservation and Plant Regeneration of Malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott). *HortScience*, 54(3):1–5.
- Manju, B. E., Mbong, A. G., Fokunang, N. C., Tembe-Fokunang, A. E., & Hanna, R. (2017). Application of *in-vitro* micropropagation technique for sustainable production of four local taro cultivars [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] in Cameroon. *African Journal of Biotechnology*, 16(30), 1638-1645.

- Martínez-Estrada, E., Islas-Luna, B., Pérez-Sato, J. A., & Bello-Bello, J. J. (2019). Temporary immersion improves *in vitro* multiplication and acclimatization of *Anthurium andreaeanum* Lind. *Scientia Horticulturae*, 249, 185-191.
- Mazariegos-Sánchez, A., Águila-González, J. M., Milla-Sánchez, A. I., Espinosa-Zaragoza, S., Martínez-Chávez, J., & López-Sánchez, C. (2017). Cultivo De Malanga (*Colocasia esculenta* Schott) En Tuxtla Chico, Chiapas, México. *Agroproductividad*, 10(3), 75-80.
- Miyoshi, S., Yamada, T., & Yoshika, S. (1971). Studies on soil-borne diseases of taro-plant by continuous cropping. (1) Appearances of diseases by continuous cropping and its control effect of cultivating by alternation of land usage between dry and flooded conditions. *Bulletin of Fukuoka Agricultural Research Centre*, 9, 45-48.
- Mordocco, A. M., Brumbley, J. A., & Lakshmanan, P. (2009). Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(4), 450.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murota, M., Sakamoto, Y., Tomiyama, K., Ozaki, M., Manabe, M., Iwahashi, T., & Fukukawa, T. (1984). Actual conditions of taro planting in the main producing districts of Miyazaki prefecture and some methods to prevent injury by continuous cropping. *Bulletin of Miyazaki Agricultural Experimental Station*, 39-53.
- Niemenak, N., Noah, A. M., & Omokolo, D. N. (2013). Micropropagation of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) in temporary immersion bioreactor. *Plant biotechnology reports*, 7(3), 383-390.
- Niemenak, N., Saare-Surminski, K., Rohsius, C., Ndoumou, D. O., & Lieberei, R. (2008). Regeneration of somatic embryos in *Theobroma cacao* L. in temporary immersion bioreactor and analyses of free amino acids in different tissues. *Plant cell reports*, 27(4), 667-676.
- Noorfarahzilah, M., Lee, J. S., Sharifudin, M., MohdFadzelly, A., & Hasmadi, M. (2014). Applications of composite flour in development of food products. *International Food Research Journal*, 21(6), 2061–2074.
- Olguín P.C., López O.S., Álvarez A.M.C., Chávez G.J.L. (1995). Uso de Malanga (*Colocasia esculenta*) y Espinaca de Agua (*Ipomoea aquatica*), en la Elaboración de Microsilos. En *Avances de Investigación 93-94 en el Campus Veracruz*. Instituto de Recursos Naturales-Colegio de Postgraduados. Pág. 32.
- Olguín P.C., Reta M.J.L., Del Castillo G.O. (1990). Utilización de ingredientes no convencionales (Azolla sp), Malanga (*Colocasia esculenta*) y pequeños peces nativos (*Poecilia* sp) de las Zonas Bajas Tropicales en la elaboración de tres dietas para tilapia roja (*Orochromis mossambicus*). IV Congreso.

- Olguín-Palacios, C., & Álvarez-Ávila, M. D. C. (2011). La malanga [*Colocasia esculenta* (L.) Schott] bajo un enfoque de investigación-desarrollo. *Agroproductividad*, 4(4), 26-34.
- Onwueme, I. (1999). Taro cultivation in Asia and the Pacific. Food and Agriculture organization of the United Nations Regional office for Asia and the Pacific Bangkok, Thailand.16, 1-9.
- Ooka J, Brennan B M (2000). Crop profile for taro in Hawaii. College of Tropical Agriculture and Human resources, University of Hawaii-Manoa.
- Pereira, P. R., Corrêa, A. C. N. T. F., Vericimo, M. A., & Paschoalin, V. M. F. (2018). Tarin, a Potential Immunomodulator and COX-Inhibitor Lectin Found in Taro (*Colocasia esculenta*). *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(4), 878-891.
- Pérez E.M., Ramírez-Malagón R, Núñez-Palenius HG, Ochoa-Alejo N (1999) Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México.
- Quiala, E., Cañal, M. J., Meijón, M., Rodríguez, R., Chávez, M., Valledor, L., Fera, M., & Barbón, R. (2012). Morphological and physiological responses of proliferating shoots of teak to temporary immersion and BA treatments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109(2), 223-234.
- Ramírez-Mosqueda MA, Iglesias-Andreu LG (2016) Evaluation of different temporary immersion systems (BIT®, BIG, and RITA®) in the micropropagation of *Vanilla planifolia* Jacks. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 52:154-160.
- Ramos-Castellá, A., Iglesias-Andreu, L. G., Bello-Bello, J., & Lee-Espinosa, H. (2014). Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50(5), 576-581.
- Regueira, M., Rial, E., Blanco, B., Bogo, B., Aldrey, A., Correa, B., Varas, E., Sánchez, C., & Vidal, N. (2018). Micropropagation of axillary shoots of *Salix viminalis* using a temporary immersion system. *Trees*, 32(1), 61-71.
- Rodríguez R.M.Y. 2006. Obtención y caracterización de almidones modificados de malanga (*Colocasia esculenta*) y trigo (*Triticum sativum*) y su aplicación en la fabricación de Yogurt. Tesis de Maestría en Ciencias Alimentarias. Facultad de Nutrición, Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz.
- Roels, S., Escalona, M., Cejas, I., Noceda, C., Rodriguez, R., Canal, M. J., Sandoval, J., & Debergh, P. (2005). Optimization of plantain (*Musa AAB*) micropropagation by temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82(1), 57-66.
- Sankar-Thomas, Y. D., & Lieberei, R. (2011). Camptothecin accumulation in various organ cultures of *Camptotheca acuminata* Decne grown in different culture systems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(3), 445-454.
- Sankar-Thomas, Y. D., Saare-Surminski, K., & Lieberei, R. (2008). Plant regeneration via somatic embryogenesis of *Camptotheca acuminata* in temporary immersion system (TIS). *Plant cell, tissue and organ culture*, 95(2), 163-173.

- Scherer, R. F., Garcia, A. C., de Freitas Fraga, H. P., Dal Vesco, L. L., Steinmacher, D. A., & Guerra, M. P. (2013). Nodule cluster cultures and temporary immersion bioreactors as a high performance micropropagation strategy in pineapple (*Ananas comosus* var. *comosus*). *Scientia Horticulturae*, 151, 38-45.
- Schumann, A., Berkov, S., Claus, D., Gerth, A., Bastida, J., & Codina, C. (2012). Production of galanthamine by *Leucojum aestivum* shoots grown in different bioreactor systems. *Applied biochemistry and biotechnology*, 167(7), 1907-1920.
- Singh, D., Jackson, G., Hunter, D., Fullerton, R., Lebot, V., Taylor, M., Iosefa, T., Okpul, T., & Tyson, J. (2012). Taro leaf blight—a threat to food security. *Agriculture*, 2(3), 182-203.
- Steingroewer, J., Bley, T., Georgiev, V., Ivanov, I., Lenk, F., Marchev, A., & Pavlov, A. (2013). Bioprocessing of differentiated plant *in vitro* systems. *Engineering in Life Sciences*, 13(1), 26-38.
- Steinmacher, D. A., Guerra, M. P., Saare-Surminski, K., & Lieberei, R. (2011). A temporary immersion system improves *in vitro* regeneration of peach palm through secondary somatic embryogenesis. *Annals of Botany*, 108(8), 1463-1475.
- Subhash, C., Sarla, S., & Jaybardhan, S. (2012). Phytochemical screening of Garhwal Himalaya wild edible tuber *Colocasia esculenta*. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(3), 181–186.
- Teisson, C., Alvard, D. (1999). *In vitro* production of potato microtubers in liquid medium using temporary immersion. *Potato Res.*, 42, 499-504.
- Temesgen, M., & Retta, N. (2015). Nutritional potential, health and food security benefits of taro *Colocasia esculenta* (L.): A review. *Food Science and Quality Management*, 36, 23–30.
- Ubalua, A. O., Ewa, F., & Okeagu, O. D. (2016). Potentials and challenges of sustainable taro (*Colocasia esculenta*) production in Nigeria. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 4, 053-059.
- Vives, K., Andújar, I., Lorenzo, J. C., Concepción, O., Hernández, M., & Escalona, M. (2017). Comparison of different *in vitro* micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 131(1), 195-199.
- Watt, M. P. (2012). The status of temporary immersion system (TIS) technology for plant micropropagation. *African Journal of Biotechnology*, 11(76), 14025-14035.
- Welander M, Persson J, Asp H, Zhu LH (2014) Evaluation of a new vessel system based on temporary immersion system for micropropagation. *Scientia Horticulturae* 179:227–232.
- Yam, T. W., Hsu, G. I., & Arditti, J. (1990). Plant regeneration *in vitro* of South Pacific taro (*Colocasia esculenta* var. *esculenta* cv. Akalomamale, Aracea). *Plant cell reports*, 9(4), 229-232.
- Yang, L., Zambrano, Y., Hu, C. J., Carmona, E. R., Bernal, A., Pérez, A., Zayas, C. M., Yang-Rui, L., Guerra, A., Santana, I., & Arencibia, A. D. (2010). Sugarcane metabolites produced in CO<sub>2</sub>-rich temporary immersion bioreactors (TIBs) induce tomato (*Solanum lycopersicum*) resistance against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(6), 558-568.