



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

TRABAJO DE DIPLOMA

TITULO

**ORGANOGENESIS DIRECTA Y EMBRIOGENESIS INDIRECTA EN EL
CULTIVO IN VITRO DE QUEQUISQUE
(*Xanthosoma sagittifolium* (L.) SCHOTT), CULTIVAR BLANCO**

AUTOR:

Br. MIGUEL ANGEL ZELEDON MAIRENA

ASESOR:

Ing. Agr. MARBELL AGUILAR MARADIAGA

MANAGUA, FEBRERO DEL 2006

INDICE GENERAL

CONTENIDO		Pág.
	ÍNDICE GENERAL	i
	ÍNDICE DE TABLA	iv
	ÍNDICE DE FIGURA	vi
	ÍNDICE DE GRÁFICOS	vii
	ÍNDICE DE ANEXOS	viii
	DEDICATORIA	ix
	AGRADECIMIENTO	x
	RESUMEN	xi
I	INTRODUCCIÓN	1
II	OBJETIVOS	5
III	MATERIALES Y MÉTODOS	6
3.1	Genotipos utilizados	6
3.2	Materiales y equipos	6
3.3	Medidas de asepsia	7
3.4	Estudios realizados	7
3.5	Organogénesis directa	8
3.5.1	Fase de establecimiento	8
3.5.1.1	Preparación del material de siembra	8
3.5.1.2	Preparación de los medios de cultivo	9
3.5.1.3	Diseño experimental y análisis estadístico	10

3.5.1.4	Variables evaluadas	10
3.5.2	Fase de multiplicación	11
3.5.2.1	Selección del medio de cultivo	11
3.5.2.2	Diseño experimental y análisis estadístico	12
3.5.2.3	Variables evaluadas	12
3.5.3	Fase de enraizamiento	12
3.5.3.1	Medios de cultivo	12
3.5.3.2	Diseño experimental y análisis estadístico	13
3.5.4	Fase de aclimatización	13
3.5.4.1	Variables evaluadas	14
3.5.5	Efecto del número de explantes por contenedor	14
3.5.5.1	Diseño y análisis estadístico	14
3.5.5.2	Variables evaluadas	14
3.5.6	Inmersión temporal	15
3.5.6.1	Diseño y análisis estadístico	15
3.5.6.2	Variables evaluadas	16
3.6	Embriogénesis indirecta	16
3.6.1	Inducción de callos	16
3.6.1.1	Variables evaluadas, diseño y análisis estadístico	17
3.6.2	Multiplicación de callos	17
3.6.2.1	Variables evaluadas y análisis estadístico	18
3.6.3	Formación de embriones	18
3.6.3.1	Variables evaluadas y análisis estadístico	19
3.6.4	Maduración de embriones somáticos	19

3.6.4.1	Variables evaluadas y análisis estadístico	20
3.6.5	Germinación de embriones	20
3.6.5.1	Variables evaluadas y análisis estadístico	21
3.6.6	Enraizamiento	21
3.6.7	Aclimatización	21
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	23
4.1	Fase de establecimiento	23
4.2	Fase de multiplicación	29
4.3	Fase de enraizamiento	41
4.4	Fase de aclimatización	43
4.5	Número de explantes por contenedor	46
4.6	Inmersión temporal	49
4.7	Embriogénesis somática indirecta	52
4.7.1	Fase de iniciación de callos	52
4.7.2	Fase de multiplicación de callos	53
4.7.3	Fase de formación de embriones	55
4.7.4	Fase de maduración de embriones globulares	57
4.7.5	Germinación de embriones	59
4.7.6	Fase de enraizamiento	59
4.7.7	Fase de aclimatización	60
V	CONCLUSIONES	62
VI	RECOMENDACIONES	65
VII	BIBLIOGRAFIA	66
VIII	ANEXOS	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Contenido	Pág.
1	Concentraciones de ácido indolacético (AIA) Y dos de bencilaminopurina (BAP), en la fase de establecimiento	10
2	Concentraciones de ácido indolacético (AIA) Y de bencilaminopurina (BAP), en la fase de multiplicación	11
3	Concentraciones de ácidoindolacético (AIA), y de sacarosa en fase de enraizamiento	13
4	Variantes de medio de cultivo	17
5	Variantes de medios de cultivo en fase de multiplicación de callos	18
6	Variantes de medios de cultivo en fase de formación de embriones	19
7	Variantes de medios de cultivo en fase de maduración de embriones	20
8	Variantes de medios de cultivo en fase de germinación de embriones	20
9	Longitud de planta, número de hojas y longitud de brotes a los 60 días de establecidos de yemas terminales	26
10	Longitud de planta, número de hojas y longitud de brotes a los 60 días de establecidos de yemas axilares	29
11	Longitud de planta, número de hojas y longitud de brotes y número de hojas por brotes en el primer subcultivo de plantas obtenidas de yemas terminales	31
12	Longitud de planta, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes en el segundo subcultivo de plantas obtenidas de yemas terminales	33
13	Longitud de planta, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes en el tercer subcultivo de plantas obtenidas de yemas terminales	34
14	Longitud de planta, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes y en el primer subcultivo de plantas obtenidas de yemas axilares	36
15	Longitud de planta, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes en el segundo subcultivo de plantas obtenidas de yemas axilares	38
16	Longitud de planta, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes y en el tercer subcultivo de plantas obtenidas de yemas axilares	40

17	Longitud de plantas, número de hojas y número de raíces en plantas reproducidas de yemas terminales en tres variantes de medios de cultivo.(fase de enraizamiento)	42
18	Longitud de plantas, número de hojas y número de raíces en plantas reproducidas de yemas axilares en tres variantes de medios de cultivo.(fase de enraizamiento)	43
19	Longitud de plantas, número de hojas, diámetro deseudotallo y porcentaje de sobrevivencia en plantas reproducidas de yemas terminales en tres variantes de medios de cultivo. (fase de aclimatizacion)	44
20	Longitud de plantas, número de hojas, diámetro deseudotallo y porcentaje de sobrevivencia en plantas reproducidas de yemas axilares en tres variantes de medios de cultivo.(fase de aclimatizacion)	45
21	Longitud de planta, número de hojas, número de raíces y número de brotes y longitud de brotes, número de hojas por brotes en plantas obtenidas de yemas terminales	47
22	Longitud de planta, número de hojas, número de raíces y número de brotes y longitud de brotes, número de hojas por brotes en plantas obtenidas de yemas axilares	48
23	Longitud de plantas, número de hojas, número de raíces y número de brotes en plantas reproducidas de yemas terminales	49
24	Longitud de plantas, número de hojas, número de raíces y número de brotes en plantas reproducidas de yemas axilares	50
25	Porcentaje de iniciación de callos, explantes con raíces y formación de plantas a partir de ápices	52
26	Porcentaje de formación de callos en los diferentes tratamientos	54
27	Resultados de formación de embriones somáticos en diferentes medios de cultivo	55
28	Resultados de la maduración de embriones globulares por efecto de diferentes medios de cultivo	57
29	Porcentaje de plantas germinadas a partir de embriones globulares en diferentes medios de cultivo	58
30	Resultado promedio por planta, a las cuatro semanas de enraizadas	60
31	Resultado promedio por planta, a las cuatro semanas de aclimatizadas	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1	Cormo madre con yemas apicales y axilares	8
2	Ápices del cultivar Blanco	9
3	Contenedores de inmersión temporal (RITA)	15
4	Ápices meristemático	16
5	Dinámica de diferenciación de ápices terminales y axilares	24
6	Plántulas en fase de multiplicación	32
7	Plantas propagadas de yemas terminales en la fase de aclimatización a los 45 días	44
8	Plantas propagadas de yemas axilares en la fase de aclimatización a los 45 días	45
9	Micropropagación del cultivar en recipientes de inmersión temporal automatizado	49
10	Contenedor RITA	51
11	Callos friables a los 30 días	52
12	Callos en crecimiento en fase de multiplicación	54
13	Callos embriogénicos y embriones globulares	56
14	Proceso de germinación de embriones	59
15	Plantas en fase de aclimatización	61

ÍNDICE DE GRAFICOS

Gráfico	Contenido	Pág.
1	Porcentaje de color verde, color marrón, y plantas formadas en ápices terminales a los 30 y 45 días en nueve variantes de medio de cultivo	24
2	Porcentaje de color verde, color marrón, y plantas formadas en ápices terminales a los 60 días de establecidos en nueve variantes de medio de cultivo	25
3	Porcentaje de color verde, color marrón, y plantas formadas en ápices axilares a los 30 y 45 días de establecidos en nueve variantes de medio de cultivo	27
4	Porcentaje de color verde, color marrón, y plantas formadas de yemas axilares a los 60 días de establecidos en nueve variantes de medio de cultivo	28
5	Plantas regeneradas de yemas terminales, primer subcultivo	31
6	Plantas regeneradas de yemas terminales, segundo subcultivo	33
7	Plantas regeneradas de yemas terminales, tercer subcultivo	35
8	Plantas regeneradas de yemas axilares, primer subcultivo	37
9	Plantas regeneradas de yemas axilares, segundo subcultivo	39
10	Plantas regeneradas de yemas axilares, tercer subcultivo	41

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo	Contenido	Pág.
1	Laboratorio de cultivo de tejidos	74
2	Preparación del material de siembra	74
3	Desinfección del material de siembra	75
4	Fases de propagación in vitro en quequisque	75
5	Composición del medio base, Murashige y Skoog (1962)	76

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, ser supremo y creador de todas las cosas.

Mi madre Concepción Mairena Montenegro, a quien le debo la vida, no solo por traerme al mundo si no por cultivarme con cariño, apoyo y dedicación.

AGRADECIMIENTO

El autor expresa su agradecimiento a:

- **Dios nuestro señor, por haberme dado la fuerza, para poder realizar el presente trabajo.**
- **Ing. Agr. Marbell Aguilar Maradiaga, por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo de tesis.**
- **Ing. Agr. Msc. Guillermo Reyes Castro por su colaboración en el presente trabajo.**
- **Ing. Agr. Álvaro Benavides, por su colaboración en el presente trabajo.**
- **Byron Saúl Castillo López, por su apoyo y su amistad.**
- **Mis padres y hermanos, por su apoyo y comprensión.**
- **Lic. Maria Elena Rodríguez, por su grata compañía, por sus valiosos consejos , apoyo y colaboración incansable, para la terminación de este trabajo.**
- **Ing. Agr. MSc. Juan José Avelares, por su apoyo para la terminación del presente trabajo.**
- **Con el animo de no ofender a aquellos que puedan faltar si menciono nombres de los que ofrecieron su desinteresada ayuda, prefiero abrazarlos a todos en un simple gesto de profundo agradecimiento.**

A todos ellos.

Muchas Gracias.

Miguel Zeledón.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo desarrollar la metodología de micropropagación para la organogénesis directa y embriogénesis indirecta a partir de dos fuentes de explantes (terminales y axilares) en el cultivar de quequisque Blanco (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). En el proceso de organogénesis directa se estudio la fase de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatización, utilizando las diferentes variantes del medio cultivo básico Murashige y Skoog (MS 1962), también se estudió el efecto del número de explantes por frasco y la técnica de inmersión temporal. En los diferentes ensayos se establecieron un esquema de diseño BCA, y para el análisis de los datos de las variables paramétricas evaluadas se realizó un ANDEVA, y en las no paramétricas el análisis de χ^2 . En la fase de establecimiento utilizando yemas terminales. La formación de plantas se dió en el medio 0.0 y 1 mg/l de AIA con 1 y 2 mg/l de BAP, utilizando yemas axilares la mejor fue con 0.50 y 1mg/l de AIA con 1y 2 mg/l de BAP. En la fase de multiplicación, con plantas formadas de yemas terminales, en el primer subcultivo, la mayor brotación se presentó en los medios que contenía con 3 mg/l de BAP sin AIA, mientras en el segundo con 0.25 mg/l de AIA con 3 de BAP y en el tercer subcultivo se dio con 2 mg/l de BAP y 0.25 de AIA, utilizando yemas axilares, en el primero y tercer subcultivos se dio con 3 mg/l de BAP sin AIA, y en el segundo subcultivo la mayor brotación se dio 3 mg/l de BAP, con 0.5 de AIA. En la fase de enraizamiento, utilizando yemas terminales, el mayor porcentaje de emisión de raíces se presentó en el medio sólido con sales al 50% y utilizando yemas axilares fue mayor en el medio sólido al 100% de sales mas 1mg/l de AIA. . En la fase de aclimatización con yemas terminales la sobrevivencia fue del 100% en los medios sólidos con sales al 50 y 100% y en el liquido con 100% de sales más 1mg/l de AIA y con yemas axilares la sobrevivencia fue del 100%, tanto en el medio liquido con 100% de sales más 1mg/l de AIA como en el medio sólido con sales al 100%. En el número de explantes por frasco utilizando yemas terminales la mayor brotación se presentó con 4 explantes por frasco y con yemas axilares fue con 5 explantes. En el sistema RITA (Recipiente de inmersión temporal automatizado) utilizando las dos fuentes de tejidos el mayor promedio de brotación se obtuvo utilizando 2 inmersiones por día durante 7 minutos. En embriogénesis indirecta la relación mayor porcentaje de formación de callos y menor formación de plantas fue en el medio constituido por las sales MS al 100% con 2 y 3 mg/l de 2,4-D. En la fase de multiplicación de callos, el porcentaje de crecimiento se dio con 5% de agua de coco y 0.4 mg/l de kinetina. El mayor porcentaje de embriones globulares formados fue en el medio con 20 y 30 mg/l de AIA. El mayor promedio de embriones globulares maduros se produjo en el medio que no se le agregó 0.1 mg/l de AIA y BAP. La germinación de embriones globulares fue mayor en el medio sin BAP y sacarosa al 3%. En el enraizamiento y la aclimatización de plantas los resultados obtenidos fueron muy similares a los de organogénesis directa, con sobrevivencia del 95% y no se observo la presencia de plantas con variación genética.

I INTRODUCCIÓN

El quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* L.) Schott) perteneciente a la familia de las Araceae; es originario de América; cultivado desde la época precolombina en las Antillas, América Central y Sur (López *et al.*, 1995, Blanco 1987, Dávila *et al.*, 2000) es considerado uno de los primeros cultivos domesticados por el hombre (López *et al.*, 1995). Recientemente, el quequisque y otras especies *Xanthosoma* han ganado gran valor como alimento debido a sus características organolépticas y nutritivas (López *et al.*, 1995).

La mayor producción en Nicaragua se localiza en las zonas húmedas del país y esta fundamentalmente en manos de pequeños y medianos productores de la Región Autónoma del Atlántico Sur, Nueva Guinea, Rama y Río San Juan. También se cultiva en el norte del país como Waslala y Río Blanco y en el Pacífico, en los departamentos Masaya, Granada, Carazo, Rivas, León y Chinandega, donde el principal abastecedor es Masaya.

El quequisque es uno de los cultivos de agro exportación más importante, (CENAGRO, 2001). Como producto de exportación no tradicional ha generado divisas al país, aunque en los últimos años las áreas de siembra se han reducido drásticamente debido al daño que provoca en los cormos y cormelos el hongo (*Phytophthora myriophyllum*) y en el follaje el virus conocido como Dasheen Mosaic Virus (DsMV) en los diferentes genotipos de quequisque (INTA, 2000).

La forma de propagación vegetativa de este cultivo es a través del cormo, con lo que se logra reproducir la información genética del progenitor garantizando la identidad y estabilidad genética de la descendencia, por lo que se espera un buen rendimiento de una población originada de una buena planta madre (Nyland, 1968). Sin embargo, esta forma de reproducción tiene la desventaja de transmitir y propagar plagas y enfermedades virales, fungosas y bacterianas. En general los métodos de propagación tradicionales no son efectivos para mantener genotipos libres de enfermedades; por lo que, a través de

esta vía ha sido grande la diseminación de enfermedades, entre las que se destacan las virales, siendo el DsMV el de mayor importancia (Hartman, 1994; Monge *et al.*, 1987).

Esta problemática plantea la necesidad de aplicar técnicas que permitan el fomento de este cultivo y brinden al agricultor la oportunidad de obtener cosechas rentables producto de la utilización de semillas sanas y vigorosas.

La propagación de plantas a través de la técnica de cultivo de tejidos permite el reemplazo del proceso sexual como de la propagación vegetativa no aséptica (Altamirano & Acuña 2000). Gómez (1991), indican que se han desarrollado sistemas de cultivo *in vitro* con diferentes objetivos: la micro propagación (Gómez *et al.*, 1989) la conservación del germoplasma (Staritsky, 1980) y la obtención de plantas libre de virus (Hartman, 1974; Jackson *et al.*, 1977; Monge *et al.*, 1987).

El proceso de micropropagación de planta esta constituido por cinco fases según (Orellana, 1998). La fase 0: (Preparativa), fase 1: (Establecimiento del cultivo aséptico), fase 2: (Multiplicación), fase 3: (Enraizamiento), fase 4: (Adaptación).

Entre las técnicas de cultivo de tejidos se encuentran los procesos de organogénesis y embriogénesis. Estas técnicas representan una alternativa que permiten no solo mejorar la calidad genética, fisiológica y fitosanitaria de un gran número de especies vegetales, sino que además son fundamentales en el proceso de transformación genética de las plantas para lo cual es necesario el establecimiento de protocolos que faciliten la regeneración adventicia ya sea mediante las rutas organogénicas o embriogénicas (Pliego & Barceló, 2001).

La organogénesis es el proceso por el que las células y tejidos son forzados a sufrir una serie de cambios que tiene como resultado final una estructura unipolar, ya sea un primordio de brote o de raíz cuyo sistema vascular esta a menudo conectado con el tejido madre (Pliego & Barceló, 2001).

La organogénesis se clasifica en directa e indirecta (Litz & Jarret, 1991) es directa cuando los brotes se forman del explante y es indirecta cuando se forman a partir de callos. Jiménez (1998), por otra parte afirma que la organogénesis puede hacerse por dos vías: la formación de yemas axilares y yemas adventicias. Orellana (1998), afirma que con la micropropagación vía organogénesis utilizando yemas axilares se ha demostrado en muchas especies como el método más confiable para lograr un proceso repetible sin alteraciones genéticas y libres de contaminantes.

Las técnicas de micropropagación a partir de meristemas o de ápices caulinares demandan mucho trabajo y requieren de grandes espacios en el laboratorio, además el costo de producción de las plantas es muy alto, imposibilitando su adquisición a los productores. Para resolver estas limitantes, se han adaptado varios tipos de biorreactores para la micropropagación de plantas.

Teisson & Alvard (1994), describieron un sistema de propagación a gran escala denominada Recipientes de inmersión temporal automatizada (RITA).

Las ventajas de los sistemas de inmersión sobre la micropropagación tradicional parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo como son: aporte más eficiente de los elementos nutritivos, mínima interrupción del intercambio de gases entre el explante o embrión y la atmósfera, no hay acumulación excesiva de gases nocivos para los tejidos y la dispersión de los tejidos por efecto del flujo de aire en recipiente (Pérez *et al.*, 1998).

La existencia de embriogénesis somática en quequisque Blanco abre la posibilidad de automatizar la producción de vitroplanta libre de virus e incrementar los genotipos promisorios para la producción de material de siembra de alta calidad a bajo costo, lo que contribuirá a aumentar el rendimiento y la calidad de la cosecha.

La embriogénesis somática son estructuras bipolares que tiene un eje radical aislado por un tejido epidérmico y no posee conexión vascular con el tejido materno.

De acuerdo con Lindsey & Jones (1992), los embriones somáticos pueden desarrollarse y germinar de modo análogo a la germinación de los embriones cigóticos, a partir de células, tejidos u órganos. La embriogénesis somática es directa cuando los embriones se producen a partir de células somáticas del explante original, es indirecta cuando el desarrollo del embrión es a partir de callos o de suspensiones celulares. Los embriones somáticos se pueden obtener de varias fuentes de tejidos tales como: hojas jóvenes e inmaduras, inflorescencia, pecíolos etc (Gómez, 1998).

Un problema de la embriogénesis somática es la obtención de una gran cantidad de embriones anormales: (1) de diferentes formas, dobles, triples o en racimos (2) variación en número y morfología (3) anomalías en el sistema apical (4) germinación prematura (5) pérdida del potencial morfogénico con el tiempo.

La generación de plantas a partir de células tanto de embriogénesis somática tanto directa como indirecta es una oportunidad para obtener altos niveles de fidelidad fitogenética porque permite seleccionar las características deseables desde muy temprano, en caso de que haya una respuesta bastante uniforme (Krikorian, 1991). Merkle *et al.*, (1996), destacan que la aplicación de la embriogénesis somática en la propagación masiva y en la transferencia de genes, es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a multiplicarse indefinidamente.

Con la realización del actual estudio se pretende desarrollar la metodología de micro propagación para la organogénesis directa y embriogénesis indirecta a partir de explantes tanto de yemas terminales como de yemas axilares, contribuyendo de esta manera a mejorar los sistemas de producción del quequisque Blanco (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schoot).

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Desarrollar la metodología de micropropagación para la organogénesis directa y embriogénesis indirecta a partir de dos fuentes de explantes en el cultivar de quequisque Blanco (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott).

2.2 Objetivos Específicos

- 1.** Definir los mejores medios de cultivo en organogénesis directa en las fases de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y la respuesta de aclimatización en el sombreadero.
- 2.** Estudiar el efecto del número de explantes por frasco en la tasa de multiplicación.
- 3.** Conocer la respuesta del cultivar Blanco a la técnica de inmersión temporal.
- 4.** Estudiar los diferentes medios de cultivo en cada una de las fases del proceso de embriogénesis indirecta.

III. Materiales y Métodos

El presente estudio de organogénesis directa y embriogénesis indirecta en el cultivo de quequisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott), se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetal del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km 12 ½ carretera norte, geográficamente a 12°08' latitud Norte y 86°10' longitud Oeste con una altitud de 56 msnm en el departamento de Managua. El periodo de duración del estudio comprendió desde Junio 2004 – Febrero 2006.

3.1 Genotipo utilizados

Quequisque blanco. Este material fue obtenido en áreas de producción ubicadas la comunidad de Susucayán del municipio El Jícaro departamento de Nueva Segovia.

3.2 Materiales y equipos

Los materiales necesarios para la realización del estudio fueron: Ácido clorhídrico (HCl), alcohol, hipoclorito de sodio (NaClO₃), reguladores de crecimiento, como el ácido indolacético (AIA), bencilaminopurina (BAP o BA), ácido diclorophenoxiacético (2,4 D), ácido indolbutírico (IBA), ácido naftalenacético (ANA), agua de coco, kinetina, macro y micronutrientes del medio básico de cultivo Murashige & Skoog (1962), sacarosa, agar, papel aluminio, cinta adhesiva transparente, agua destilada, detergente.

Equipos utilizados: horno, mechero, marcadores, autoclave, pinzas, pipetas, beakers, tubos de ensayo, balanza analítica, escalpelos, placas petri esterilizadas, cuchillos, tijeras, cámaras de flujo laminar, freezer (4 °C), agitador electromagnético, frasco erlenmeyer y medidor de pH.

3.3 Medidas de asepsia

Los equipos usados para el cultivo de tejidos: pinzas y escalpelos fueron esterilizados en horno a 170 °C durante una hora. Los tubos de ensayo se introdujeron en una solución de NaClO₃ al 2% durante dos horas, posteriormente se lavaron con agua y detergentes. Una vez preparados los diferentes medios de cultivo, fueron esterilizados antes de la siembra en el autoclave a 120 °C y una atmósfera de presión durante 20 minutos.

El cuarto de siembra y la cámara de flujo laminar se desinfectó previamente a la siembra con luz ultravioleta durante 15 minutos, luego se dejó media hora sin presencia de luz ultra violeta, para iniciar la siembra *in vitro*. El medio de cultivo fue luego vertido en tubos de ensayo en la cámara de flujo laminar.

3.4 Estudios realizados

Se establecieron una serie de experimentos en el que se estudiaron las diferentes fases del proceso de organogénesis directa, así como el desarrollo metodológico del proceso de embriogénesis indirecta.

En la organogénesis directa se estudiaron las fases de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatización, utilizando yemas apicales y axilares extraídas de cormos de plantas en estado adulto.

El estudio de embriogénesis indirecta, se realizó con el objetivo de lograr la inducción de callo (utilizando ápices meristemáticos extraídos de plantas procedentes de la fase de multiplicación), la multiplicación de callos, formación de embriones somáticos, maduración de embriones somáticos y la germinación de estos, logrando así la formación de una planta completa y su posterior enraizamiento y aclimatización.

3.5 Organogénesis directa

3.5.1 Fase de establecimiento

3.5.1.1 Preparación del material de siembra

Se seleccionaron yemas terminales y axilares del cormo madre del cultivar de quequisque Blanco, posteriormente se procedió a lavar los tejidos con agua y detergente. Las yemas axilares extraídas se sembraron en canteros para su brotación, después de dos meses de establecidos cuando las plantas alcanzaron entre 20 y 25 cm. de longitud, se procedió a la extracción de los ápices caulinares. En ambos tipos de tejidos una vez efectuada la limpieza, se realizó la extracción de los ápices con ayuda de cuchillo hasta reducirlos a un tamaño de aproximadamente 2 cm de largo y 1 cm de ancho. Se practicó un segundo lavado con agua y detergente durante 30 minutos, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos y para eliminar los residuos de cloro se efectúan tres enjuagues continuos con agua destilada estéril. En la cámara de flujo laminar se realizó la segunda desinfección con cloro al 2% durante 5 minutos, los residuos se eliminaron con el mismo procedimiento de la primera desinfección.



Figura 1. Izquierda, Cormo madre con yemas apicales y axilares. Derecha, rebrotes de yemas axilares a los 45 días de establecidas en canteros.

Los ápices extraídos fueron puestos en placas Petri y con la ayuda de escalpelos y pinzas se redujeron a un tamaño de aproximadamente 0.5 cm de alto y 0.5 cm de ancho (Fig. 2) para luego ser sembradas individualmente con todas las condiciones asépticas. Los

tejidos se establecieron en tubos de ensayo de 150 x 25 mm conteniendo 10 ml de medio de cultivo semi-sólido.

Finalizada la siembra de los explantes, se sellaron los tubos de ensayo con cinta plástica transparente. Posteriormente los tejidos fueron trasladados al cuarto de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas con temperatura de 27 °C, intensidad de luz de 2000 lux, 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.



Figura 2. Ápices de cultivar Blanco.

3.5.1.2 Preparación de los medios de cultivo

En las diferentes fases del estudio de organogénesis los medios de cultivo se prepararon de acuerdo a los protocolos descritos para el cultivo del quequisque (Anexo 5). Los medios utilizados para esta fase se muestran en la tabla 1.

Una vez preparadas las diferentes variantes de medios de cultivos, se adicionó el gelificante Phytigel (Sigma) a razón de 3 g/l. Se ajustó el pH a 5.8 con hidróxido de sodio (NaOH) y ácido clorhídrico (HCl) y se distribuyeron 10 ml de medio de cultivo por tubo de ensayo los cuales tenían una dimensión de 2.50 x 15 cm.

Tabla 1. Concentraciones ácido indolacético (AIA) y dos de bencilaminopurina (BAP) en fase de establecimiento.

Medio de cultivo MS (1962)	Reguladores de crecimiento	
	AIA (mg /l)	BAP (mg/l)
1	0.0	0.0
2	0.5	0.0
3	1.0	0.0
4	0.0	1.0
5	0.5	1.0
6	1.0	1.0
7	0.0	2.0
8	0.5	2.0
9	1.0	2.0

3.5.1.3 Diseño experimental y análisis estadístico

En el estudio de establecimiento se utilizó un diseño estadístico unifactorial de Bloques Completos al Azar (BCA) con 5 repeticiones (tubos de ensayo 25 x 15 cm), donde cada unidad experimental estaba formada por 20 explantes, tanto para plantas obtenidas de yemas apicales como de rebrotes. Para el procesamiento estadístico se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y después la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$ para determinar diferencias significativas entre los tratamientos.

3.5.1.4 Variables evaluadas

A los 30 y 45 días se evaluaron las variables:

- a- Porcentaje de contaminación
- b- Porcentaje de supervivencia (verde, marrón y planta)

A los 60 días se evaluaron:

- a- Porcentaje de supervivencia

- b- Longitud de las plantas formadas (cm)
- c- Número de hojas
- d- Altura de brotes: escala 1-3mm, 4-6mm, >6mm
- e- Número de brotes axilares

Para las variables no paramétrica se realizó la prueba de Chi – cuadrado (χ^2), para el análisis se utilizó el paquete estadístico SAS (versión 8.0).

3.5.2 Fase de multiplicación

3.5.2.1 Selección del medio de cultivo

Para conocer el mejor medio de cultivo en la fase de multiplicación, utilizando tejidos tanto de yemas terminales y axilares, se estudiaron 12 variantes de medios de cultivo durante 3 subcultivos sucesivos. Para el estudio se tomaron plantas formadas en la sección 3.5.1 y se les eliminaron hojas, brotes axilares y raíces, reduciendo los explantes a un tamaño aproximado de 1 cm (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones de ácido indolacético (AIA) y de bencilaminopurina (BAP) en fase de multiplicación.

Medio de cultivo MS (1962)	Reguladores de crecimiento	
	AIA (mg /l)	BAP (mg/l)
1	0.00	0.0
2	0.25	0.0
3	0.50	0.0
4	0.00	1.0
5	0.25	1.0
6	0.50	1.0
7	0.00	2.0
8	0.25	2.0
9	0.50	2.0
10	0.00	3.0
11	0.25	3.0
12	0.50	3.0

3.5.2.2 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño estadístico unifactorial de Bloques Completos al Azar (BCA) cada tratamiento conformado por 5 repeticiones (5 contenedores con capacidad de 250 ml). Para el análisis estadístico primero se realizó una prueba de varianza de clasificación doble (ANDEVA) y para la determinación de las diferentes estadísticas se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$.

3.5.2.3 Variables Evaluadas

A las 4 semanas se evaluaron las variables:

- a- Longitud de planta (cm)
- b- Número de hojas por planta
- c- Número de brotes
- d- Longitud de brotes (cm)
- e- Número de hojas por brotes
- f- Número de raíces (sin raíces, de 1-3 raíces, y < 4)

3.5.3 Fase de enraizamiento

3.5.3.1 Medios de cultivo

Con plantas formadas de las dos fuentes de material vegetativo (yemas terminales y axilares) se procedió a evaluar el efecto en la producción de raíces por efecto de los medios reportados por Nguyen Thi & Nguyen Van (1987), García *et al.*, (1999) y Dottin *et al.*, (1999), utilizando medio de consistencia sólida y líquida. En la tabla 3 se presentan los medios correspondientes.

Tabla 3. Concentraciones de AIA y de sacarosa en fase de enraizamiento.

Medios cultivo	Reguladores de crecimiento	
	Sales MS (1962) (%)	AIA (mg /l)
1 Nguyen Thi & Nguyen Van (1987)	100	0.0
2 García, M. <i>et al.</i> , (1999).	50	0.0
3 Dottin, M. <i>et al.</i> , (1999)	100	1.0

3.5.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño bifactorial de bloque completamente al azar (BCA), y un análisis de varianza (ANDEVA) y después la prueba de rango múltiple de Duncan – Waller $\alpha=0.05$ para determinar la diferencia significativa entre los tratamientos. Evaluándose las siguientes variables:

a-Longitud de planta

b- Número de hojas

c-Número de raíces (promedio)

3.5.4 Fase de aclimatización

El objetivo principal de esta fase es lograr la adaptación de las vitroplantas al medio ambiente externo, con las altas tasas de sobrevivencia en corto tiempo y con bajo costo, siendo ésta fase una de las más importantes para la micropropagación.

Para conocer la respuesta a la aclimatización se utilizaron plantas formadas en los tres de medios de cultivos MS (100% de sales, 50%, y 100%), y las dos consistencias de los mismos (líquido y sólida) de la sección 3.5.5.

La aclimatación de las plantas se realizó en un sombreadero cubierto con malla plástica (zarán) que reduce la intensidad luminosa al 60%. Las plantas fueron sembradas en bolsas de polietileno con dimensiones de 6.24 cm x 12.48 cm en sustrato orgánico humus de lombriz. Para garantizar una humedad relativa del 80%, se les suministró riego por micro nebulizadores durante 10 minutos 3 veces al día.

Se utilizó el mismo diseño y análisis de la sección 3.5.3.

3.5.4.1 Variables evaluadas

En la fase de aclimatización se evaluaron las siguientes variables:

- a- Longitud de planta
- b- Número de hojas
- c- Diámetro deseudotallo
- d- Porcentaje de supervivencia

3.5.5 Efecto del número de explantes por contenedor

Se estudió el efecto en la brotación axilar que produce el número de explantes por contenedor (4, 5 y 6), explantes respectivamente. Se seleccionaron las variantes de medio de cultivo de acuerdo a los mejores resultados obtenidos en la sección 3.5.2.

3.5.5.1 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño unifactorial de bloques completamente al azar (BCA), para el análisis estadístico primero se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y para la determinación de las diferentes estadísticas entre los tratamientos se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$.

3.5.5.2 Las variables evaluadas fueron:

- a-Número de brotes producido por explante

b- Altura de la planta

c- Número de hojas por planta

3.5.6 Inmersión temporal

En el estudio de inmersión temporal se empleó la metodología desarrollada por Escalona *et al.*, (1999) reportada por Dottin (2000). Se utilizaron contenedores conocidos como Recipientes de inmersión temporal automática (RITA) con capacidad de 500 ml. Para el estudio se tomaron plantas formadas en la fase de multiplicación (sección 3.5.2) y se les eliminaron hojas, brotes axilares y raíces, reduciendo los explantes a un tamaño aproximado de 1 cm. Se empleó el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS (1962) con 2 mg/l de BAP ajustándose el pH a 5.8. Se adicionaron 200 ml de medio líquido por contenedor y se colocaron en los estantes del cuarto de crecimiento, con fotoperíodos de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad a una temperatura de 27 ± 1 °C utilizando dos frecuencias de inmersiones diarias: dos inmersiones por día de 7 minutos cada una y tres inmersiones diarias de 7 minutos cada una.



Figura 3. Contenedores RITA.

3.5.6.1 Diseño experimental y análisis estadístico

El ensayo se estableció, utilizando un diseño unifactorial BCA. Se utilizaron tres RITAS por tratamiento conteniendo cada uno 10 explantes por cultivar. Para el análisis estadístico primero se realizó una prueba de varianza de tipo (ANDEVA) y para la determinación de las diferentes estadísticas se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$.

3.5.6.2 Variables Evaluadas

A las tres semanas se evaluaron las siguientes variables:

- a- Número de brotes producidos por explantes
- b- Longitud de explantes por brotes
- c- Número de hojas
- d- Número de raíces por planta

3.6 Embriogénesis indirecta

3.6.1 Inducción de callos

Para la inducción de callos se tomaron plantas *in vitro* procedentes de la organogénesis directa y se extrajeron ápices meristemáticos de aproximadamente 1 mm de tamaño, los que se sembraron en medios de cultivo de consistencia sólida en frascos de 200 ml de capacidad, utilizando cinco contenedores con cuatro ápices cada uno, para un total de veinte ápices por variantes de medio de cultivo. El pH de los medios se fijó en 5.8. Una vez establecidos en las diferentes variantes de medios de cultivo se trasladaron al cuarto de crecimiento a condiciones de 16 horas luz y 8 de oscuridad, a temperaturas de 27 +/- 1 °C

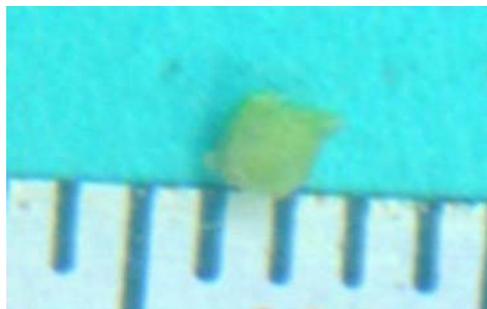


Figura 4. Ápice meristemático, escala de 1 mm.

Para la inducción de callos se utilizaron dos sustancias reguladoras del crecimiento: auxinas el ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2- 4, D) en concentraciones de 0.0, 2.0 y 5.0 mg/l y ácido indolbutírico (IBA); citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP) en concentraciones de (0.0, 0.5 y 1.0 mg/l) como se detalla en la tabla N° 4.

Tabla 4. Variantes de medios de cultivos.

Variante de medio de cultivo MS (1962)	Reguladores de crecimiento			
	Sales MS (%)	2,4-D (mg /l)	BAP (mg/l)	IBA (mg/l)
1	50	1.0	0.0	0.0
2	50	2.0	0.0	0.0
3	50	3.0	0.0	0.0
4	50	0.0	0.2	2.0
5	100	1.0	0.0	0.0
6	100	2.0	0.0	0.0
7	100	3.0	0.0	0.0
8	100	0.0	0.2	2.0

3.6.1.1 Variables evaluadas y análisis estadístico

En las variables no paramétricas para la determinación de los mejores tratamientos se realizó la prueba de análisis porcentual y error estándar.

A las cuatro semanas se evaluaron las siguientes variables:

- a- porcentaje de formación de callos
- b- Formación de planta
- c- Explante con raíces

3.6.2 Multiplicación de callos

A los 60 días de haberse formado los callos fueron transferidos a variantes de medios de cultivo basados en los resultados obtenidos por Dottin (2000) y Gupta (1985), para su debida multiplicación en frascos de 200 ml de capacidad, conteniendo medios de cultivo

de consistencia sólida (Tabla 5) Para ello, se seleccionaron callos friables con peso de 100 a 150 mg aproximadamente, sembrándose cuatro callos por contenedor utilizando a cinco contenedores por cada variante de medio de cultivo. Donde los tejidos permanecieron en oscuridad y temperatura de 27 +/- 1 °C durante 30 días.

Tabla 5. Variantes de medios de cultivos en fase de multiplicación de callos.

Autores	Agua de coco (%)	Kinetina (mg/l)	ANA(mg/l)
Dottin (2000)	5.0	0.4	0.0
Dottin (2000)	10	0.4	0.0
Gupta (1985)	0.0	2.0	0.2
Gupta (1985)	0.0	2.0	2.0

3.6.2.1 Variables evaluadas y análisis estadístico

Se evaluaron peso fresco en mg de callos vivos y el volumen de crecimiento de los callos conforme a las escalas propuestas por Santana (1982), en las que se establecieron cinco escalas. Para determinar el mejor tratamiento se realizó la prueba de análisis porcentual y error estándar.

Escala utilizada:

- 1- Callo muerto
- 2- Callo vivo pero sin crecimiento
- 3- Callos vivos y con pequeños puntos de crecimiento
- 4- Callos creciendo el 50% de su volumen
- 5- Callo creciendo el 100% de su volumen

3.6.3 Formación de embriones somáticos

Para la formación de embriones, se tomaron callos friables formados en la sección 3.6.2. Para lograr la formación, se estudiaron cuatro niveles de AIA (0.0, 20, 25 y 30 mg/l) en combinación con 50g de sacarosa (Tabla 6). Se utilizaron cuatro tejidos por

contenedor. El pH de los medios se fijó en 5.8. Una vez establecidos en las diferentes variantes de medios de cultivo se trasladaron al cuarto de crecimiento a condiciones de 16 horas luz y 8 de oscuridad, a temperaturas de 27 +/- 1 ° C

Tabla 6. Variantes de medios de cultivos en fase de formación de embrión.

Variante de medio de cultivo MS (1962)	AIA (mg/l)	Sacarosa (g/l)
1	0.0	50
2	20	50
3	25	50
4	30	50

3.6.3.1 Variables evaluadas y análisis estadístico

Para determinar el mejor tratamiento en las tres variables se realizó la prueba de análisis porcentual y error estándar . Las evaluaciones se realizaron a las cuatro semanas, utilizando las siguientes variables:

- a- Callos con embriones globulares
- b- Número de embriones globulares
- c- Callos con raíces

El número de embriones globulares se contabilizó con ayuda de un estereoscopio.

3.6.4 Maduración de embriones somáticos

Para la maduración de los embriones somáticos se seleccionaron embriones en etapa globular obtenidos de la sección 3.6.3; se utilizaron frascos de 200 ml de capacidad, con medios de cultivo de consistencia sólida, utilizando 4 callos por contenedor. El pH de los medios se fijó en 5.8. Una vez establecidos en las diferentes variantes de medios de cultivo se trasladaron al cuarto de crecimiento a condiciones de 16 horas luz y 8 de oscuridad, a temperaturas de 27 +/- 1 ° C

Las variantes de medios de cultivo se seleccionaron de acuerdo a los resultados obtenidos por García (1997), Sábados *et al.*, (1993) y Bancroft (1998).

Tabla 7. Variantes de medios de cultivos en fase de maduración de embriones.

Autores	2,4-D (mg /l)	AIA (mg/l)	BAP (mg/l)
García (1997)	0.0	0.0	0.0
Szabados <i>et al.</i>, (1993)	0.1	0.0	0.1
Bancroft (1998)	0.0	0.1	0.1

3.6.4.1 Variables evaluadas y análisis estadístico

Para determinar el mejor tratamiento en las variables (callos con raíces) se utilizó la prueba de análisis porcentual y error estándar. En las demás variables se utilizó un diseño BCA y la prueba de Duncan - Waller $\alpha= 0.05$. Las evaluaciones se realizaron a las cuatro semanas, las variables utilizadas fueron:

- 1- Número de embriones globulares por callo
- 2- Número de embriones maduros
- 3- Callos con raíces

3.6.5 Germinación de embriones

Los embriones maduros se seccionaron en segmentos de 0.5 cm y fueron sometidos a condiciones similares a las practicadas en el experimento de la sección 3.6.1.

Tabla 8. Variantes de medios de cultivo en la fase de germinación de embriones.

Variante de medio de cultivo MS	BAP (mg/l)	Sacarosa (g/l)
1	0.0	30
2	0.1	30
3	0.2	30
4	0.3	30

3.6.5.1 Variables evaluadas y diseño experimental.

Para la determinación del mejor tratamiento, en la variable plantas germinadas se realizó la prueba de análisis porcentual y el error estándar y para el número de planta se utilizó un BCA y la prueba de rango múltiple de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$. Las variables evaluadas fueron:

- a- Porcentaje de plantas germinadas
- b- Número de planta

3.6.6 Enraizamiento

En esta fase se seleccionaron plantas provenientes de la germinación de embriones maduros y fueron sembradas cinco plantas por frascos que contenían 20 ml de medio de cultivo. Utilizando cuatro frascos en total. El medio de cultivo utilizado fue el que resultó mejor en la sección 3.5.3.

Se utilizó un diseño unifactorial de bloques completamente al azar (BCA). Para el procedimiento estadístico se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y para la diferencia entre los tratamientos se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$.

Para estudiar la respuesta al enraizamiento se evaluaron a los cuarenta días las variables:

- a- Longitud de plantas
- b- Número de hojas
- c- Número de raíces
- d- Número de brotes promedios

3.6.7 Aclimatización

Se emplearon plantas procedentes de la fase de enraizamiento, las que fueron trasladadas a condiciones de sombreadero. Las condiciones de aclimatización fueron mismas provenientes de la sección 3.5.4. El diseño y análisis fue igual al de la sección 3.6.6.

A las cuatro semanas de aclimatizadas se evaluaron veinte plantas, además del porcentaje de sobrevivencia, las variables evaluadas fueron:

b- Longitud de plantas

c- Número de hojas

d- Diámetro de seudotallo.

IV. Resultados y discusión

4.1 Fase de establecimiento

En el cultivo de quequisque, López & Vásquez (1995), reportan diferencias en crecimiento y desarrollo entre plantas propagadas de distintas partes del corno primario, comparadas con plantas reproducidas a partir de la planta principal o planta madre. Estos mismos autores destacan que plantas procedentes de la yema terminal, son más grandes que las procedentes de las restantes secciones del corno, debido a que ahíjan poco.

El crecimiento del cultivo de tejidos y de órganos y la morfogénesis *in vitro*, son más influenciados por el genotipo que por otros factores (George, 1993). El estado fisiológico de la planta que dona el explante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, existiendo diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales, cuando los tejidos provienen de plantas con diferentes edades fisiológicas (Jiménez, 1998).

4.1.1 Ápices de yemas terminales

Los resultados de la fase de establecimiento de ápices del cultivar a los 30 y 45 días indican que concentraciones de 0, 0.50 y 1 mg/l de AIA en combinación con 1 mg/l de BAP favorecieron la formación de plantas, encontrándose sin embargo, que la combinación 1 mg/l de AIA con 1 mg/l de BAP resultó ser el mejor medio con 75% a los 30 días y 90% a los 45 días; el mayor porcentaje de explantes color verde se presentó en los medios que contenían BAP con o sin adición de AIA con rango de 90-100% a los 30 días y 70-85% a los 45 días; el mayor porcentaje de color marrón se presentó al no adicionar reguladores de crecimiento con un porcentaje de 60% y 90% respectivamente (Gráfico 1).

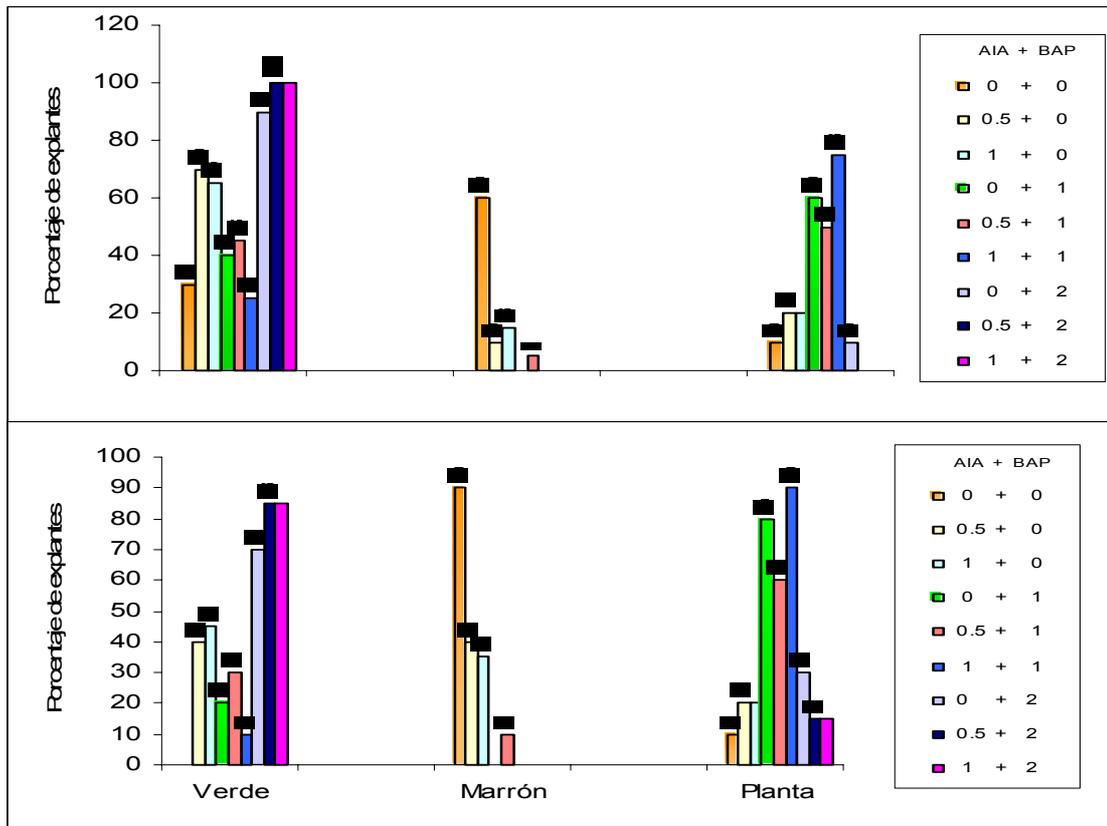


Gráfico 1. Porcentajes de color verde, color marrón y planta formada de yemas terminales del cultivar a los 30 días en la parte superior y parte inferior a los 45 días de establecidos en nueve variantes de medios de cultivo. La dinámica de los ápices se observa en la figura 5.



Figura 5. Dinámica de diferenciación de yemas terminales y axilares: de izquierda a derecha: (a) ápice color marrón (b) ápice color verde (c) planta formada (d) planta formada con brote axilar.

En los medios de cultivo a los que se les agregó cantidades de 0 y 1 mg/l de AIA con 1 mg/l de BAP y 0 mg/l de AIA con 2 mg/l de BAP, la formación de plantas fue del 100% (Gráfico 2). El color marrón se presentó en el 65% de los ápices en el medio sin reguladores de crecimiento.

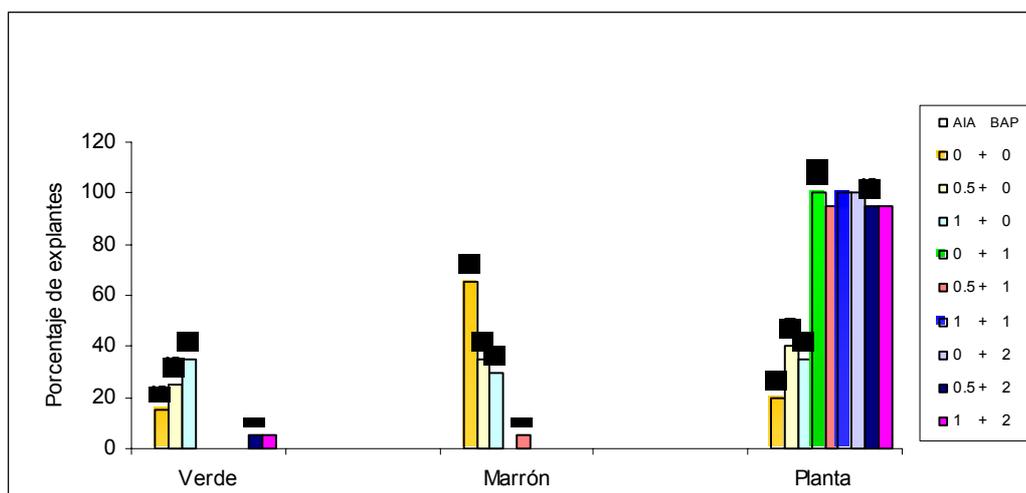


Gráfico 2. Porcentajes de color verde, color marrón y plantas formadas de yemas terminales del cultivar blanco a los 60 días de establecidos en nueve variantes de medios de cultivos.

La prueba de rango múltiple de Duncan demuestra que en longitud de planta y en número de hojas, hay diferencia estadística significativa entre los medios 1 mg/l de AIA combinado con 1 mg/l de BAP y 0 mg/l de AIA combinado con 1 mg/l de BAP con respecto a los demás tratamientos. En el análisis de χ^2 refleja que las plantas con las mayores escalas de longitud de brotes se obtuvo en los tratamientos del 4 al 9, siendo estos los mejores resultados, aunque estos fueron iguales estadísticamente entre sí, y superiores estadísticamente con respecto a los demás tratamientos.

Tabla 9. Longitud de plantas, número de hojas y longitud de brotes a los 60 días de establecidos de ápices de yemas terminales. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí tanto para la prueba de rangos múltiples tanto para Duncan como para χ^2 $\alpha = 0.05$

N° de trat.	AIA BAP (mg/l)		Longitud de planta (cm.)	Número de hojas	Longitud de brotes (escala en mm)				χ^2
	0	1-3			4-6	> 6			
1	0.0	0.0	0.900 ef	1.250 d	95	5	0	0	b
2	0.5	0.0	0.945 def	1.450 d	100	0	0	0	b
3	1.0	0.0	0.705 f	1.550 d	100	0	0	0	b
4	0.0	1.0	2.105 ab	4.500 a	40	30	15	15	a
5	0.5	1.0	1.635 bcd	3.550 bc	70	15	10	5	a
6	1.0	1.0	2.480 a	4.150 ab	55	30	5	10	a
7	0.0	2.0	1.720 bc	3.750 bc	60	20	5	15	a
8	0.5	2.0	1.49 bcde	3.400 c	70	20	5	5	a
9	1.0	2.0	1.39 cdef	3.400 c	60	20	5	15	a

4.1.2 Ápices de yemas axilares

A los 30 días en los medios que se les agregó 1 mg/l de BAP combinado con 0, 0.5 y 1 mg/l de AIA se presentó la mayor formación de plantas con 70, 75 y 80% respectivamente. A los 45 días la formación de plantas se vio favorecida cuando se adicionaron concentraciones de 1 y 2 mg/l de BAP con o sin AIA, con promedios entre el 65 y 100% de las plantas formadas, lo que indica que el BAP es esencial para el metabolismo celular de los explantes. Comparado con los resultados observados con los ápices de yemas terminales, los ápices de yemas axilares respondieron mejor en cuanto a la formación de plantas y menor porcentaje de explantes de color marrón (Gráfico 3).

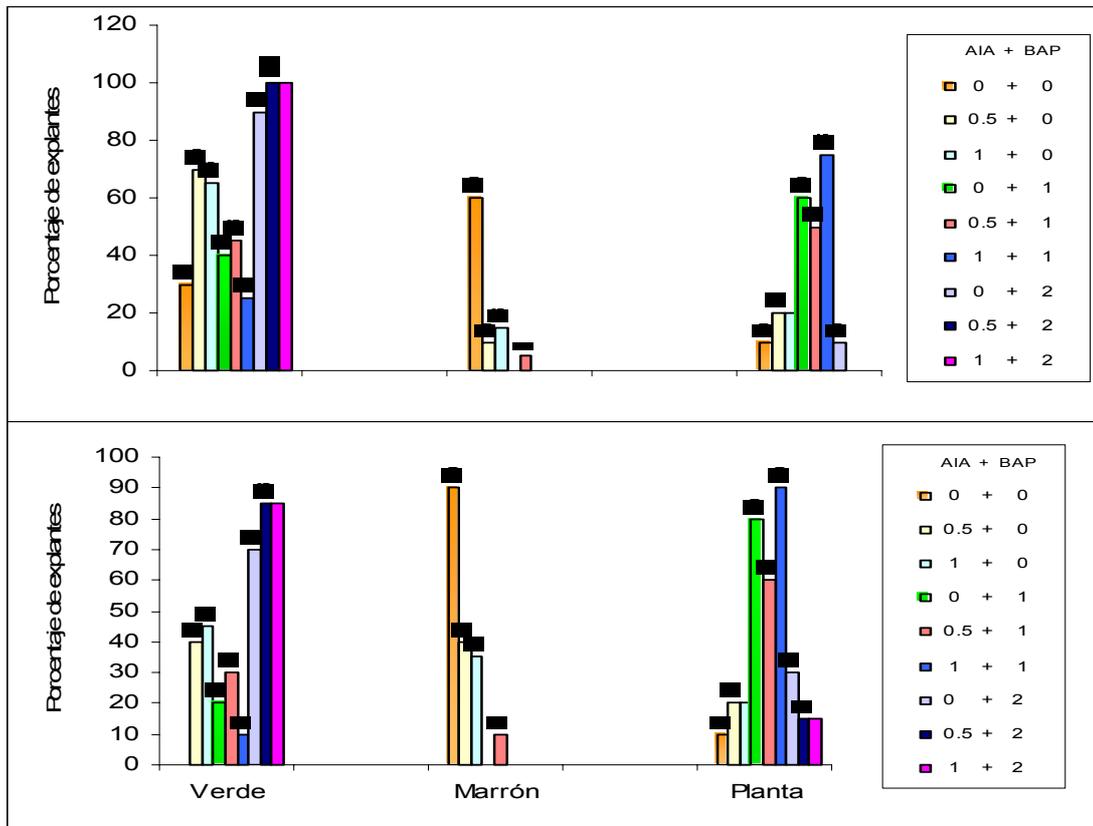


Gráfico 3. Porcentajes de color verde, color marrón y planta formada de yemas axilares a los 30 días arriba y 45 días abajo de establecidos en nueve variantes de medios de cultivo.

Thorpe (1991), señala que aún cuando las auxinas son necesarias para la mitosis y síntesis de ADN, y citocinesis, estos procesos se producen cuando hay niveles adecuados de citoquininas por la influencia que ejercen sobre el metabolismo de los ácidos nucleicos y de las proteínas. George (1991), dice que el crecimiento y la morfogénesis *in vitro* son regulados por la interacción y balance entre los reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo y las sustancias de crecimiento segregadas endógenamente.

A los 60 días en el medio suplementado con 1 y 2 mg/l de BAP con o sin adición de AIA se presentaron los mejores resultados de plantas formadas con promedios del 70 al 100%. El porcentaje de plantas color marrón se expresó entre el rango de 10-15% con mayor tendencia a presentarse en los medios a los que no se le adicionó BAP (Gráfico 4).

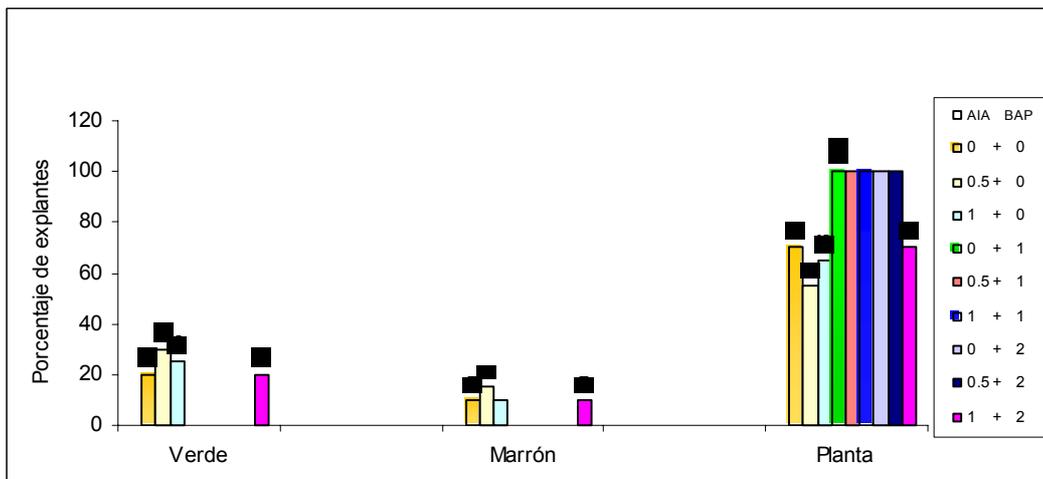


Gráfico 4 Porcentajes de color verde, color marrón y plantas formadas de yemas axilares del cultivar a los 60 días de establecidos en nueve variantes de medios de cultivo.

El balance apropiado de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo está determinado por las concentraciones endógenas de estas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante. Algunas especies son cultivadas sin adición de ningún regulador externo, probablemente debido a que existe suficiente cantidad endógenas de hormonas (Jiménez, 1998).

La longitud de planta y el número de hojas fue mejor en el medio que contenía 0.5 mg/l de AIA con 2 mg/l de BAP. El porcentaje de explantes con mayor longitud de brotes se obtuvo en los tratamientos 5, 6 y 7, aunque fueron estadísticamente iguales entre sí, según χ^2 , pero con diferencias estadísticas con respecto a los demás tratamientos (Tabla 10).

Tabla 10. Longitud de plantas, número de hojas y longitud de brotes a los 60 días de establecidos de yemas axilares. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí tanto para la prueba de rangos múltiples como para χ^2 $\alpha = 0.05$

Nº de trat.	Medios de cultivo AIA BAP (mg/l)		Longitud de planta (cm.)	Número de hojas	Longitud de brotes (escala en mm)				χ^2
	0	1-3			4-6	> 6			
1	0.0	0.0	0.800 c	1.700 cd	100	0	0	0	b
2	0.5	0.0	1.325 bc	1.40 d	100	0	0	0	b
3	1.0	0.0	0.825 c	1.300 d	90	10	0	0	b
4	0.0	1.0	1.275 bc	4.100 bc	90	10	0	0	b
5	0.5	1.0	2.075 ab	4.500 b	65	10	0	25	a
6	1.0	1.0	2.300 a	5.050 b	45	25	0	30	a
7	0.0	2.0	1.250 c	4.675 b	55	10	0	25	a
8	0.5	2.0	2.800 a	6.300 a	70	0	0	30	b
9	1.0	2.0	1.325 bc	3.200 c	70	15	0	15	b

Monge *et al.*, (1987), determinaron que combinaciones hormonales de 15 mg/l de AIA y 2 mg/l de kinetina favorecieron la regeneración de plántulas en quequisque blanco y con 10 mg/l de AIA los tratamientos resultaron ser más favorables para quequisque morado.

En la base de los tejidos se observó contaminación de la bacteria identificada mediante pruebas morfológicas y bioquímicas (*Sarcina flava*). Esta bacteria no se reporta como patógena del cultivo de quequisque, permitiendo que el explante continúe creciendo aún con la afectación. La contaminación se detectó en 5%.

4.2 Fase de multiplicación

El número de subcultivos está en dependencia del número de plantas a obtener a partir de un explante original (Orellana, 1994). A medida que aumenta el número de subcultivos hay una tendencia al incrementar el número de brotes por explantes y además, puede incrementarse la formación de yemas (Debergh & Maene, 1981).

En el cultivo de caña de azúcar se describe el aumento sostenido del coeficiente de multiplicación a medida que se dan más subcultivos *in vitro*. Este fenómeno puede deberse a un efecto de “habitación” de los tejidos al crecimiento en medios rico en

citoquininas. Este efecto ha sido descrito en varias especies (Evans & Bravo, 1985) y se conoce que estos tejidos comienzan a producir sus propias citoquininas bajo estas condiciones, lo cual hace que se observe una mejor estimulación para la formación de brotes axilares y adventicios.

4.2.1 Explantes de yemas terminales

4.2.1.1 Primer subcultivo

En los tratamientos 1, 2 y 3 se obtuvieron los mayores promedios de longitud de planta, presentando diferencias estadísticas con respecto a los demás tratamientos. El menor promedio se presentó en el tratamiento 8.

El número de hojas producidas en el tratamiento 12 resultó inferior estadísticamente a los valores obtenidos en los demás tratamientos, sin embargo, los mayores promedios estadístico se alcanzaron en los tratamientos 6 y 9.

El promedio de brotes axilares se favoreció en los tratamientos 8, 9, 10, 11 y 12 con similares resultados estadísticos entre sí, pero superiores a los demás tratamientos. El mayor promedio de brotación fue 1.70 y se alcanzó en el tratamiento 10, y el menor promedio en el tratamiento 3 con 1.18.

No se alcanzaron los promedios de 3.35 reportados por Gómez *et al.*, (1989), en quequisque color Blanco cuando agregaron al medio de cultivo 0.05 mg/l de AIA y 1 mg/l de BAP.

En longitud de brotes se observó un comportamiento similar al número de brotes, los mejores promedios se alcanzaron tratamientos 10, 11 y 12. En los tratamientos 1, 2 y 3 se presentaron las menores longitudes de brotes. El número de hojas por brote fue superior en los medios suplementados con 0.25 y 0.50 mg/l de AIA con 3 mg/l de BAP comparado con los promedios obtenidos en los medios que no contenían BAP (Tabla 11).

Tabla 11. Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes y número de hojas por brote en el primer subcultivo de plantas obtenidas de yemas terminales. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$

Nº de trat.	AIA (mg/l)	BAP (mg/l)	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas por brotes
1	0.00	0.0	3.05 ab	3.20 ab	0.25 c	0.35 c	0.65 bc
2	0.25	0.0	3.03 ab	3.00 abc	0.20 c	0.27 c	0.50 c
3	0.50	0.0	3.33 a	2.81 abc	0.18 c	0.28 c	0.50 c
4	0.00	1.0	2.43 cd	3.00 abc	0.45 bc	0.58 abc	0.90 abc
5	0.25	1.0	2.36 d	2.95 abc	0.35 c	0.39 bc	0.65 bc
6	0.50	1.0	2.10 de	3.25 a	0.70 bc	0.60 abc	1.05 abc
7	0.00	2.0	2.23 de	3.15 ab	0.45 bc	0.36 bc	0.85 abc
8	0.25	2.0	1.71 e	3.20 ab	1.10 ab	0.71 abc	1.35 abc
9	0.50	2.0	2.05 de	3.30 a	1.10 ab	0.60 abc	1.05 abc
10	0.00	3.0	2.12 de	2.70 bc	1.70 a	0.94 ab	1.55 abc
11	0.25	3.0	2.52 bcd	2.95 abc	1.65 a	1.08 a	1.65 ab
12	0.50	3.0	2.25 de	2.60 c	1.55 a	1.12 a	1.80 a

El porcentaje de plantas con emisión de 4 ó más raíces fue superior en los medios que no contenían BAP; en los medios que contenían niveles de 0.0, 0.25 y 0.50 mg/l de AIA combinados con 2 y 3 mg/l de BAP, del 35-85% de las plantas no produjeron raíces (Gráfico 5).

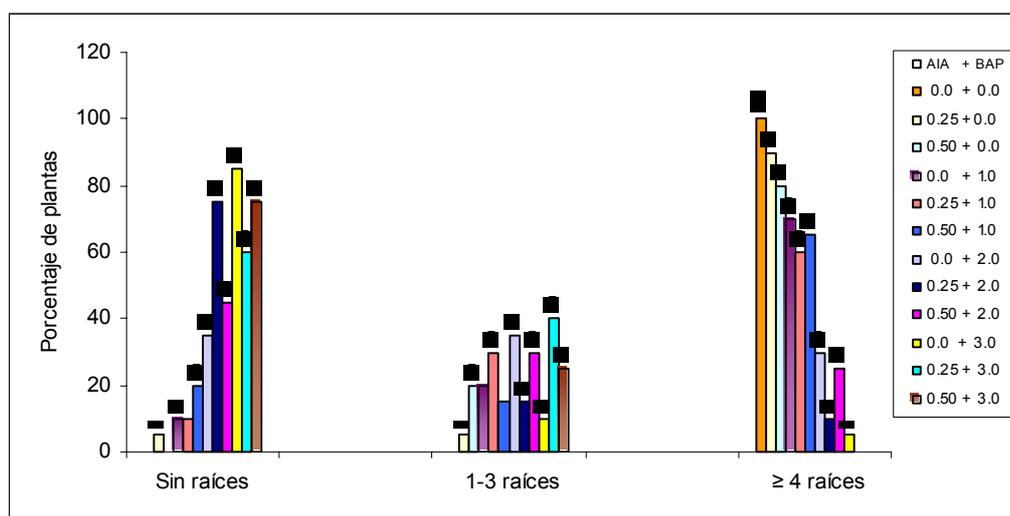


Gráfico 5. Plantas regeneradas de yemas terminales, primer subcultivo. Escala de emisión de raíces por planta: izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de 1 a 3 raíces, derecha plantas con emisión de 4 o más raíces.



Figura 6. Plántulas en fase de multiplicación.

4.2.1.2 Segundo subcultivo

Los promedios de longitud de plantas en los medios que no se les adicionó BAP superaron estadísticamente a los promedios obtenidos en los otros tratamientos. El promedio de número de hojas fue mejor estadísticamente en el tratamiento 12 con promedios de 3.45. No se registraron diferencias estadísticas en la brotación en los tratamientos del 5 al 12, pero sí éstos con respecto a los tratamientos que no contenían BAP. El mayor promedio de brotación se presentó en el medios con 0.25 mg/l de AIA con 2 mg/l de BAP.

No se registraron diferencias significativas en longitud de brotes cuando las plantas crecieron en los medios que contenían BAP. La tendencia al incremento de las variables, brotación axilar, longitud y número de hojas de brotes se produjo en los tratamientos 8, 10 y 11. En el medio de cultivo con 0.50 mg/l de AIA y 3 mg/l de BAP se observó una reducción de los promedios de número de brotes, longitud y número de hojas de los brotes en relación con los promedios obtenidos en el primer subcultivo (Tabla 12).

Tabla 12. Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes en el segundo subcultivo de plantas obtenidas de yemas terminales. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$

Nº de trat.	AIA (mg/l)	BAP (mg/l)	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas por brotes
1	0.00	0.00	3.10 a	3.05 b	0.35 bc	0.34 bc	0.70 bc
2	0.25	0.00	3.22 a	3.11 b	0.40 bc	0.24 c	0.50 c
3	0.50	0.00	3.52 a	3.05 b	0.16 c	0.16 c	0.38 c
4	0.00	1.00	2.37 c	3.15 b	0.90 ab	0.74 a	1.40 ab
5	0.25	1.00	2.52 bc	3.05 b	1.35 a	0.71 ab	1.60 a
6	0.50	1.00	2.30 c	3.00 b	1.10 a	0.94 a	1.95 a
7	0.00	2.00	2.15 c	3.05 b	1.15 a	0.79 a	1.60 a
8	0.25	2.00	2.15 c	3.05 b	1.45 a	0.90 a	1.90 a
9	0.50	2.00	2.42 bc	3.00 b	1.25 a	0.77 a	1.45 a
10	0.00	3.00	2.30 c	3.00 b	1.30 a	1.04 a	2.00 a
11	0.25	3.00	2.32 c	3.05 b	1.40 a	1.00 a	1.90 a
12	0.50	3.00	2.97 ab	3.45 a	1.15 a	0.66 ab	1.35 ab

La producción de 4 ó más raíces por explantes se presentó en el rango de 50 a 100% en todas las variantes de medios de cultivos. En los medios suplementado con 0.0 y 0.5 mg/l de AIA y 3 mg/l de BAP fueron los únicos en que el 5 y el 20% de las plantas respectivamente no emitieron raíces (Gráfico 6).

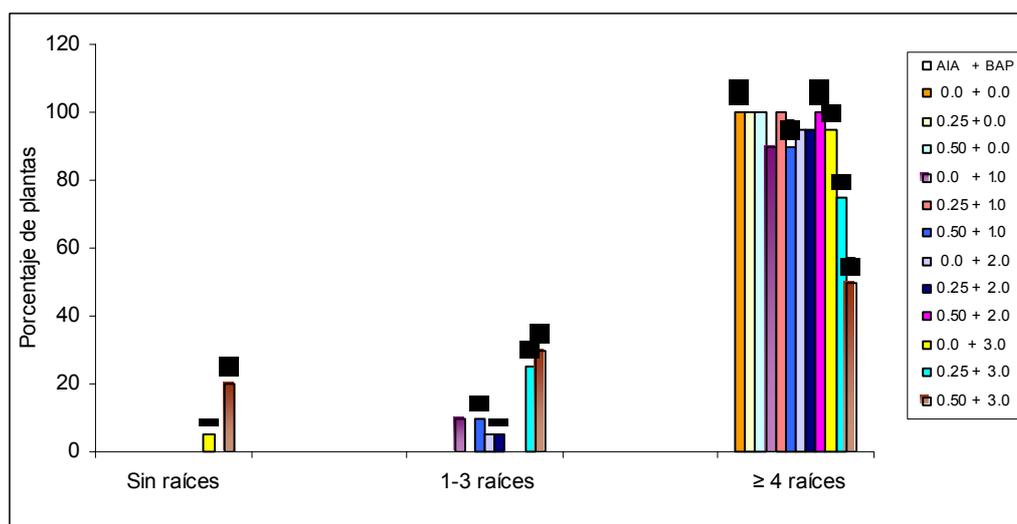


Gráfico 6. Plantas regeneradas de yemas terminales, segundo subcultivo. Escala de emisión de raíces por planta: izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de 1 a 3 raíces, derecha plantas con emisión de 4 o más raíces.

4.2.1.3 Tercer subcultivo

Similar al comportamiento del primero y segundo subcultivo, los mayores promedios en longitud de plantas se presentaron en los tratamientos que no se les agregó BAP. Estos tratamientos mostraron diferencias estadísticas significativas con respecto a los demás tratamientos. El tratamiento 6 presentó el menor promedio de longitud de plantas.

En el número de hojas no se registró diferencias estadísticas entre los tratamientos; no siendo así en el número de brotes en donde los promedios se incrementaron en los tratamientos del 7 al 12.

El mayor promedio de longitud de brotes se alcanzó en el medio suplementado con 0.50 mg/l de AIA y 3 mg/l de BAP, pero resultó estadísticamente igual a los tratamientos 4, y del 6 al 11. La variable número de hojas por brote mostró los mejores promedios en los tratamientos 8, 11 y 12. En los tratamientos 1 y 2 no se produjo brotación, por tanto, no hubo longitud de brote ni emisión de hojas (Tabla 13).

Tabla 13. Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes en el tercer subcultivo de plantas obtenidas de yemas terminales. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$

Nº de trat.	AIA BAP (mg/l)	Longitud de planta (cm)	Número de Hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas por brotes
1	0.00 0.00	3.93 a	3.40 a	0.00 e	0.00 d	0.00 d
2	0.25 0.00	3.75 a	3.25 a	0.00 e	0.00 d	0.00 d
3	0.50 0.00	3.75 a	3.45 a	0.35 de	0.01 cd	0.40 d
4	0.00 1.00	2.31 b	3.53 a	1.07 bc	0.60 ab	1.55 bc
5	0.25 1.00	1.65 de	3.20 a	0.85 cd	0.48 bc	1.30 c
6	0.50 1.00	1.52 e	3.20 a	0.95 bcd	0.53 b	1.55 bc
7	0.00 2.00	2.22 bc	3.45 a	1.40 abc	0.76 ab	2.05 ab
8	0.25 2.00	2.12 bcd	3.50 a	1.80 a	0.61 ab	2.25 a
9	0.50 2.00	1.90 bcde	3.30 a	1.40 abc	0.64 ab	1.95 abc
10	0.00 3.00	1.87 bcde	3.35 a	1.20 abc	0.57 ab	1.80 abc
11	0.25 3.00	1.92 bcde	3.25 a	1.55 ab	0.61 ab	2.30 a
12	0.50 3.00	1.77 cde	3.10 a	1.40 abc	0.83 a	2.30 a

En los medios que no se les agregó BAP las plantas produjeron el 100% de cuatro a más raíces, no obstante, en el resto de los demás tratamientos del 15 al 80% de las plantas

emitieron esa misma cantidad de raíces, y de 15 al 85% de las plantas no emitieron raíces, principalmente en los medios suplementados con 2 mg/l de BAP con o sin AIA. En los medios de número de raíces en el rango de 1-3 se presentó el porcentaje mayor en los tratamientos que se le adicionó 0.50 mg/l de AIA más 1 y 2 mg/l de BAP con porcentajes respectivos del 35 y 30% (Gráfico 7).

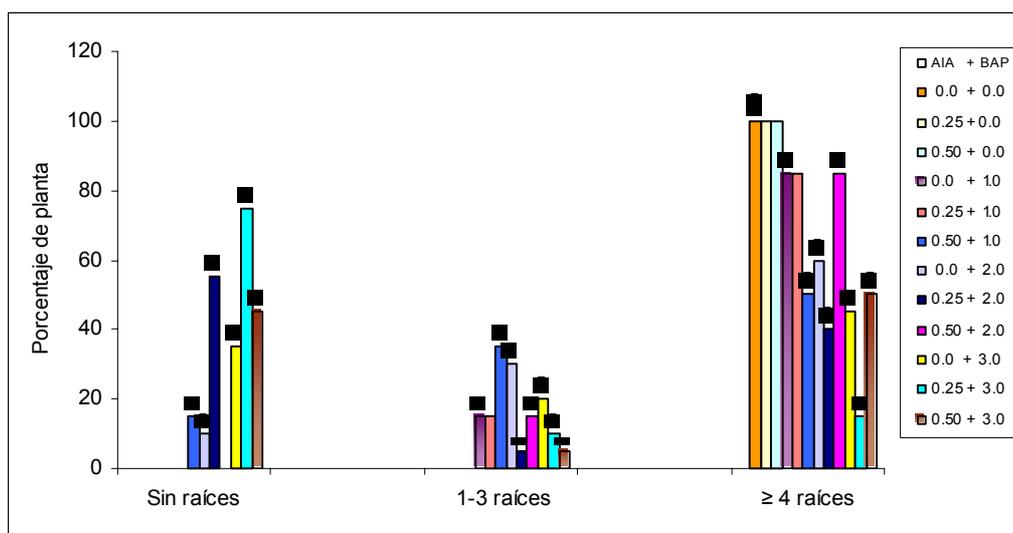


Gráfico 7. Plantas regeneradas de yemas terminales, tercer subcultivo. Escala de emisión de raíces por planta: izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de 1 a 3 raíces, derecha plantas con emisión de 4 o más raíces.

De acuerdo al comportamiento observado en la brotación axilar en los tres subcultivos del cultivar, parece indicar que hay un efecto endógeno del AIA que persiste hasta el segundo subcultivo, considerando que las plantas que crecieron en medios de cultivo con 0.0 y 0.25 mg/l de AIA y sin BAP, no se indujo brotación axilar en el tercer subcultivo; aunque en longitud y en número de hojas las plantas presentaron un buen vigor.

En la fase de multiplicación *in vitro* el objetivo es obtener un coeficiente de brotación axilar que garantice estabilidad genética, por eso es necesario adicionar a los medios de cultivo la menor concentración posible de reguladores de crecimiento. Los resultados obtenidos en el estudio, demostraron que se debe reducir la cantidad de AIA e incrementar la concentración de BAP en el primer subcultivo hasta por 3 mg/l, debido a que en el tejido existe suficiente cantidad de AIA endógeno y a partir del segundo subcultivo adicionar 0.25 mg/l de AIA y reducir 2 mg/l el BAP.

4.2.2 Explantes de yemas axilares

4.2.2.1 Primer subcultivo

En el tratamiento 2 el promedio de longitud de plantas fue significativamente superior a los promedios alcanzados en los demás tratamientos. No se presentaron diferencias estadísticas entre los promedios este tratamiento y los obtenidos en los tratamientos 1, 3, 8, 10, 11 y 12.

En el tratamiento 6 se obtuvo el mayor promedio de número de hojas. Aunque estadísticamente solo superó a los tratamientos 1 y 5. En los medios que se les adicionó BAP se registraron los mayores coeficientes de brotación resultando los tratamientos 9 y 10 los únicos que superaron el promedio de 2 brotes.

En los promedios de longitud de brotes y número de hojas por brote, el orden de comportamiento fue similar para ambas variables, resultando los tratamientos 9 y 10 los que presentaron los mejores promedios, con diferencias estadísticas superiores principalmente a los tratamientos a los que no se les adicionó BAP.

Tabla 14. Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes en el primer subcultivo de plantas obtenidas de yemas axilares. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$

Nº de trat.	AIA (mg/l)	BAP (mg/l)	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas por brotes
1	0.00	0.00	2.78 abc	2.80 b	0.35 c	0.075 e	0.15 e
2	0.25	0.00	3.52 a	2.95 ab	0.35 c	0.075 e	0.15 e
3	0.50	0.00	2.83 ab	3.10 ab	0.90 bc	0.21 de	0.45 de
4	0.00	1.00	1.92 cd	3.10 ab	1.15 bc	0.21 de	0.45 de
5	0.25	1.00	2.24 bcd	2.80 b	1.90 ab	0.37 abc	0.80 abc
6	0.50	1.00	2.14 bcd	3.35 a	1.30 abc	0.34 bcd	0.70 abcd
7	0.00	2.00	1.85 d	3.20 ab	1.65 ab	0.27 cd	0.55 cd
8	0.25	2.00	2.63 abcd	2.90 ab	1.40 ab	0.32 bcd	0.65 bcd
9	0.50	2.00	2.26 bcd	3.00 ab	2.25 a	0.50 a	1.00 a
10	0.00	3.00	2.63 abcd	3.15 ab	2.30 a	0.50 a	1.00 a
11	0.25	3.00	2.75 abcd	3.30 a	1.70 ab	0.42 abc	0.85 abc
12	0.50	3.00	2.72 abcd	3.05 ab	1.90 ab	0.47 ab	0.95 ab

Medios con solo 0.50 mg/l de AIA; 0.0, 0.25 y 0.50 mg/l de AIA con 1 mg/l de BAP y en el que se adicionó 2 mg/l de BAP fueron en los que crecieron plantas que no produjeron raíces. En el medio de cultivo sin reguladores y en los que contenían 0.50 mg/l de AIA y combinaciones de 0.25 mg/ y 0.50 mg/l de AIA con 2 mg/l de BAP y en el que contenían 0.0, 0.25 y 0.50 mg/l de AIA con 3 mg/l de BAP, la emisión de número de cuatro o más raíces se presentó en el rango de 85 al 100% de las plantas. (Gráfico 8).

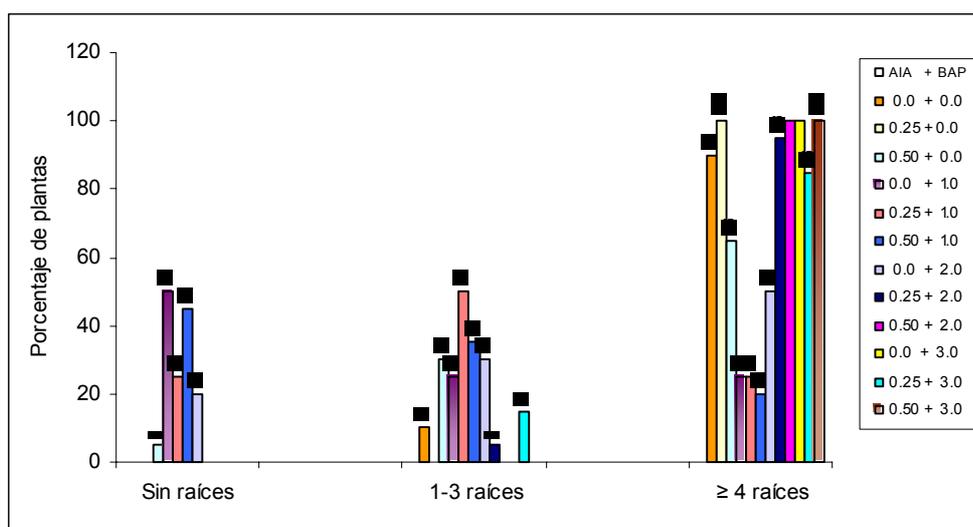


Gráfico 8. Plantas regeneradas de yemas axilares , primer subcultivo. Escala de emisión de raíces por planta: izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de 1 a 3 raíces, derecha plantas con emisión de 4 o más raíces.

4.2.2.2 Segundo subcultivo

En el tratamiento 3 se obtuvo una longitud de plantas promedio de 5.62 cm superando significativamente a los promedios de los demás tratamientos, produciendo el tratamiento 12 el menor promedio (2.15 cm).

El promedio de emisión de hojas se registró en un rango de 3.10 a 3.85, resultando, el medio suplementado con 0.50 mg/l de AIA y 3mg/l de BAP el que registró el mayor número de hojas.

La brotación axilar fue estadísticamente superior en los medios con adición de únicamente 3 mg/l de BAP combinado con 0.50 mg/l de AIA. Los promedios de brotes

obtenidos en los medios que no se les adicionó BAP y en el que contenían 0.5 mg/l de AIA con 1 mg/l de BAP resultaron significativamente inferiores a los promedios de brotes producidos en los demás medios de cultivos. Similar al variable número de brotes, el medio con 0.5 mg/l de AIA con 3 mg/l de BAP indujo a la obtención de los mejores promedios de longitud y número de hojas por brotes (Tabla 15).

Con los resultados obtenidos con explantes de yemas axilares se confirma que el cultivar Blanco se ve favorecido por la juvenilidad de los tejidos que contribuye a una mejor expresión del genotipo.

Tabla 15. Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes en el segundo subcultivo de plantas obtenidas de yemas axilares. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$

Nº de trat.	AIA (mg/l)	BAP	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas de brotes
1	0.00	0.00	4.93 b	3.55 ab	0.10 d	0.12 ef	0.25 f
2	0.25	0.00	4.86 b	3.40 bc	0.15 d	0.15 ef	0.20 f
3	0.50	0.00	5.62 a	340 bc	0.10 d	0.00 f	0.20 f
4	0.00	1.00	3.20 c	3.15 c	1.00 c	0.60 cd	1.10 d
5	0.25	1.00	4.00 c	3.15 c	1.45 bc	0.70 bcd	1.45 bcd
6	0.50	1.00	4.62 c	3.35 bc	0.20 d	0.20 ef	0.40 ef
7	0.00	2.00	2.93 ef	3.20 bc	1.20 bc	0.83 abcd	1.70 bcd
8	0.25	2.00	3.50 d	3.30 bc	1.00 c	0.47 cd	1.05 de
9	0.50	2.00	3.07 de	3.30 bc	1.70 bc	0.60 cd	1.35 cd
10	0.00	3.00	2.52 gf	3.10 c	2.60 a	0.99 ab	2.05 ab
11	0.25	3.00	2.83 gf	3.15 c	1.75 b	0.86 abc	1.90 bc
12	0.50	3.00	2.15 g	3.85 a	3.25 a	1.09 a	2.65 a

La producción en la escala de 4 a más raíces se estimuló principalmente en los tratamientos que no contenía reguladores de crecimiento, y los que contenían concentraciones de BAP de 1 a 2 mg/l combinado con niveles de 0.0, 0.25 y 0.50 mg/l de AIA. En los medios con adición de 3mg/l de BAP con o sin adición de AIA fueron los únicos tratamientos que no favoreció la producción de raíces, resultando el porcentaje de plantas sin raíces entre el 10 al 85% (Gráfico 9).

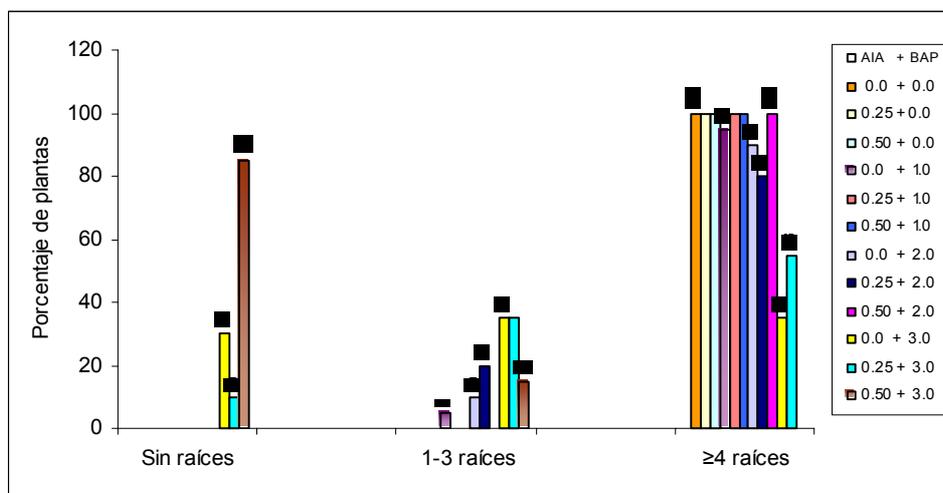


Gráfico 9. Plantas regeneradas de yemas axilares, segundo subcultivo. Escala de emisión de raíces por planta: izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de 1 a 3 raíces, derecha plantas con emisión de 4 o más raíces.

4.2.2.3 Tercer subcultivo

Similar al primero y segundo subcultivos, en el tercer subcultivo los medios que no contenían BAP presentaron los mayores promedios de longitud de planta, y el menor promedio de longitud se alcanzó en el medio suplementados con 0.50 mg/l de AIA y 3 mg/l de BAP.

En la variable número de hojas no se registraron diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados, aunque en el medio suplementado con 2 mg/l de BAP sin adición de AIA fue el que alcanzó el mejor promedio.

La brotación axilar se presentó en todos los tratamientos que se le adicionó BAP, pero resultó estadísticamente superior en los tratamientos 9 y 10. En los medios de cultivo que no se les adicionó BAP no se estimuló la brotación axilar, por tanto, no se registraron las variables longitud y número de hojas por brote en estos mismos medios.

De acuerdo a estos resultados obtenidos se puede afirmar que la brotación obtenida con tejidos extraídos de yemas axilares del cormo madre, superaron a los producidos a partir de yemas terminales.

El mayor promedio de longitud de brotes se obtuvo en el medio que contenía 0.25 mg/l de AIA con 2 mg/l de BAP, y el mayor número de hojas por brotes se obtuvieron en los medios que se les adicionó 0.5 mg/l de AIA más 2 mg/l de BAP y 0.25 mg/l de AIA con 3 mg/l de BAP, resultando significativamente superiores a los promedios de número de hojas por brote producidos en los tratamientos sin adición de BAP, con solo 1 mg/l de BAP y 0.50 mg/l de AIA (Tabla 16).

Tabla 16. Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes en el tercer subcultivo de plantas obtenidas de yemas axilares. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller $\alpha = 0.05$.

Nº de trat.	AIA (mg/l)	BAP (mg/l)	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas por brotes
1	0.00	0.00	4.42 a	3.60 ab	0.00 c	0.00 c	0.00 c
2	0.25	0.00	3.87 a	3.40 ab	0.00 c	0.00 c	0.00 c
3	0.50	0.00	3.08 b	3.40 ab	0.00 c	0.00 c	0.00 c
4	0.00	1.00	2.20 c	3.45 ab	1.20 b	0.68 ab	1.65 b
5	0.25	1.00	1.93 cd	3.45 ab	1.65 ab	0.64 b	2.10 ab
6	0.50	1.00	1.71 cd	3.25 b	1.12 b	0.51 b	1.68 b
7	0.00	2.00	2.25 c	3.85 a	1.15 b	0.66 b	2.05 ab
8	0.25	2.00	2.25 c	3.45 ab	1.55 ab	0.91 a	2.25 ab
9	0.50	2.00	2.02 cd	3.45 ab	1.95 a	0.73 ab	2.40 a
10	0.00	3.00	2.15 cd	3.35 ab	1.95 a	0.65 b	2.20 ab
11	0.25	3.00	1.79 cd	3.30 ab	1.65 ab	0.69 ab	2.35 a
12	0.50	3.00	1.59 d	3.45 ab	1.65 ab	0.51 b	2.05 ab

En el medio que contenía 0.50 mg/l de AIA con 3 mg/l de BAP el 40% de las plantas no formaron raíces y el 60% de ellas formó raíces en el rango de 1-3 raíces. Los mayores porcentajes de plantas con 4 ó más raíces se presentaron en los medios sin reguladores de crecimiento con rango entre 90 al 100% (Gráfico 10).

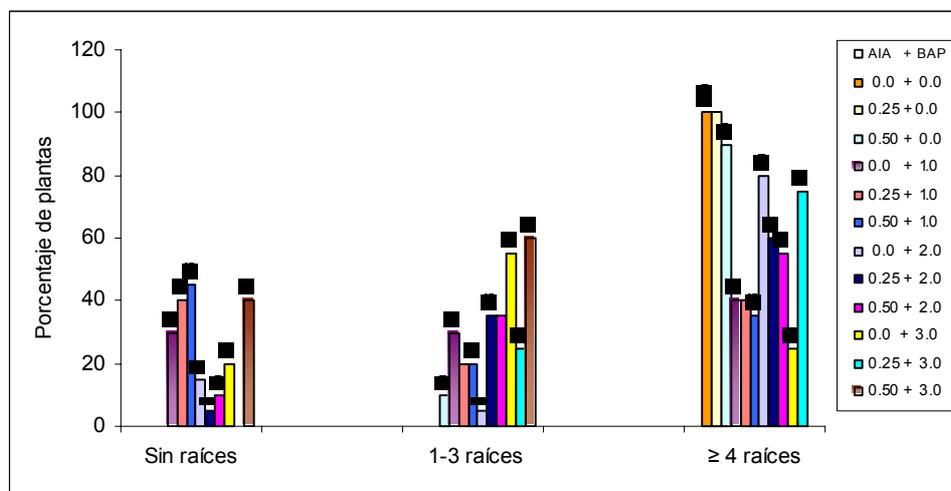


Gráfico 10. Plantas regeneradas de yemas axilares, tercer subcultivo. Escala de emisión de raíces por planta: izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de 1 a 3 raíces, derecha plantas con emisión de 4 o más raíces.

4.3 Fase de enraizamiento

4.3.1 Explantes de yemas terminales

La importancia de la fase de enraizamiento se fundamenta en que es necesario que las vitro plantas próximas a ser adaptadas a condiciones ambientales tengan suficiente raíces que las preparen a las nuevas condiciones, donde a diferencia del medio de cultivo las plantas tienen que absorber el agua y los nutrientes del sustrato.

En el medio de consistencia sólida conteniendo el 100% de las sales más 1 mg/l de AIA, el promedio de longitud de plantas fue superior estadísticamente a los obtenidos en los demás tratamientos, tanto de consistencia líquida como sólida. Los promedios de número de hojas en los medios conteniendo el 100% de las sales MS de consistencia líquida y el 50% de las sales de consistencia sólida superaron significativamente a los demás tratamientos. El número de raíces producidas en el medio con reducción al 50% de las sales y de consistencia sólida superó estadísticamente solamente a los promedios de raíces producidos en el medio conteniendo las sales MS con 1 mg/l de AIA de consistencia sólida y al medio con las sales al 50% de consistencia líquida (Tabla 17).

Los resultados demostraron que hay un efecto en la inducción de raíces en dependencia de los constituyentes del medio de cultivo y de la consistencia del mismo. Cuando se empleen medios de consistencia sólida se deben reducir las sales al 50% de su concentración sin adición de AIA, y si se trabaja con medios de consistencia líquida se deben agregar 1 mg/l de AIA al 100% de las sales MS.

Tabla 17. Longitud de planta, número de hojas y número de raíces en plantas reproducidas de yemas terminales en tres variantes de medio de cultivo. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan. $\alpha = 0.05$

Variables	Consistencia	Medios de cultivo		
		MS (100% sales)	MS (50% sales)	MS (100% sales) + 1mg/l de AIA
Longitud de planta	Líquida	1.24 b	1.26 b	1.26 b
	Sólida	1.14 b	1.38 b	2.26 a
Número de hojas	Líquida	2.76 a	2.12 b	2.00 b
	Sólida	2.00 b	2.64 a	2.00 b
Número de raíces	Líquida	5.48 abc	3.88 c	6.08 ab
	Sólida	4.20 abc	7.72 a	2.56 bc

4.3.2 Explantes de yemas axilares

La longitud de planta en el medio MS con las sales reducidas al 50% y de consistencia sólida, fue significativamente superior al promedio que se obtuvo en el medio con las sales MS al 100% con 1mg/l de AIA de consistencia líquida. Los mejores promedios de número de hojas fueron en los medios con las sales MS al 100% y 1 mg/l de AIA consistencia sólida y con las sales al 50% de consistencia líquida superando al medio con las sales MS al 100% y 1 mg/l de AIA de consistencia líquida. El número de raíces en los medios de cultivo con 100% de las sales MS y 1mg/l de AIA de consistencias sólida y el medio MS al 100% sales de consistencia líquida superaron estadísticamente al número de raíces producidos en el medio al 100% de las sales MS y 1mg/l de AIA consistencia líquida (Tabla 18).

La respuesta al enraizamiento de las plántulas producidas a partir de explantes de yemas axilares fue diferente, resultando que la mayor cantidad de raíces se induce en un medio de consistencia sólida con la adición de un mg/l de AIA a las sales MS al 100% de su

concentración y si el medio es de consistencia líquida, no se debe agregar AIA a esta misma concentración de sales.

Tabla 18. Longitud de planta, número de hojas y número de raíces en plantas reproducidas de yemas axilares en tres variantes de medio de cultivo. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan. $\alpha = 0.05$.

Variables	Consistencia	Medios de cultivo		
		MS (100% sales)	MS (50% sales)	MS (100% sales) + 1mg/l de AIA
Longitud de planta	Líquida	1.02 ab	1.14 ab	0.74 b
	Sólida	1.22 ab	1.34 a	1.22 ab
Número de hojas	Líquida	2.44 ab	2.48 a	2.04 b
	Sólida	2.28 ab	2.32 ab	2.60 a
Número de raíces	Líquida	6.00 a	3.60 ab	1.24 b
	Sólida	4.44 ab	4.76 ab	7.20 a

4.4 Fase de aclimatización

4.4.1 Explantes de yemas terminales

Una de las etapas que reviste gran importancia dentro de las técnicas de propagación *in vitro* es la aclimatización (endurecimiento) de las vitroplantas a condiciones ambientales y su posterior establecimiento a condiciones de campo. La eficiencia en la aclimatización es trascendental para la propagación comercial debido a que esta influye en todo el proceso y en la calidad final de la planta.

Las vitroplantas en un inicio deben cultivarse en condiciones que se acerquen al ambiente *in vitro*, alta humedad relativa y baja intensidad lumínica. Posteriormente debe reducirse de manera gradual la humedad relativa y aumentar la intensidad luminosa para que las plantas se desarrollen en un ambiente parecido a las condiciones de campo.

Se considera como sustrato a los materiales sólidos o porosos de origen natural o sintético que solos o combinados garantizan un adecuado crecimiento de las plantas bajo condiciones ambientales controladas. Estos tienen como función suministrar a la planta sostén mecánico, a la vez permitir que las raíces tomen aire y agua, pudiendo o no intervenir en el complejo proceso de nutrición vegetal (Tortosa, 1990)

El análisis de rangos múltiples de Duncan demostró que la interacción medio de cultivo consistencia influyó en la longitud de plantas, presentando el mayor promedio con las sales al 100% y con 1 mg/l de AIA de consistencia líquida, aunque solo superó estadísticamente a los promedios de longitud obtenidos en las dos consistencia de los medios de cultivos con las sales al 100%. En el número de hojas y diámetro de la planta no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. La tasa de sobrevivencia fue alta en un rango de 96 al 100% (Tabla 19).

Tabla 19. Longitud de planta, número de hojas, diámetro deseudotallo y porcentaje de sobrevivencia en plantas reproducidas de yemas terminales en tres variantes de medio de cultivo. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan. $\alpha = 0.05$.

Variables	Consistencia	Medios de cultivo		
		MS (100% sales)	MS (50% sales)	MS (100% sales) + 1mg/l de AIA
Longitud de planta	Líquida	5.32 b	6.45 ab	6.72 a
	Sólida	6.32 b	6.12 ab	6.35 ab
Número de hojas	Líquida	3.05 a	2.90 a	3.05 a
	Sólida	2.85 a	2.95 a	3.10 a
Diámetro de pseudotallo	Líquida	0.52 a	0.62 a	0.65 a
	Sólida	0.60 a	0.55 a	0.60 a
Sobrevivencia	Líquida	96%	96%	100%
	Sólida	100%	100%	96%

En la Figura 7, se aprecian plantas representativas en los diferentes tratamientos del cultivar Blanco, reproducidas a partir de yemas terminales en la fase de aclimatización.

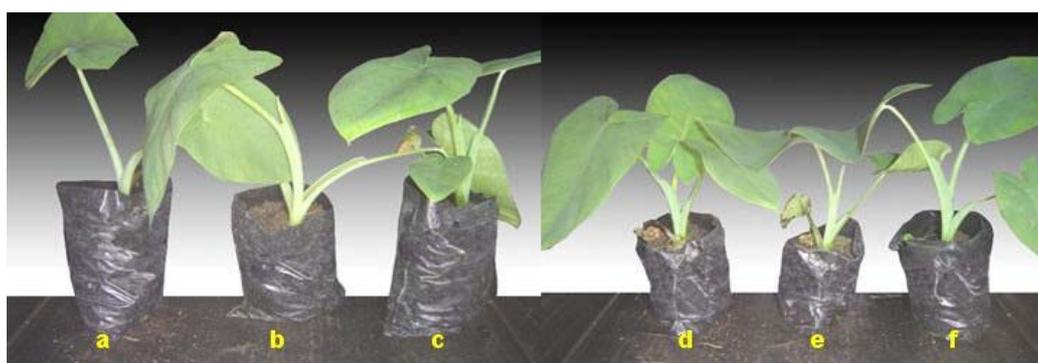


Figura 7. Plantas propagadas de yemas terminales. Fase de aclimatización a los 45 días: Izquierda, plantas previamente enraizadas en medio líquido a) medio 100% sales MS b) Medio al 50% de las sales c) Medio 100% sales más 1 mg/l de AIA. Derecha: plantas previamente enraizadas en medio sólido d) medio 100% sales MS e) Medio al 50% de las sales e) Medio 100% sales más 1 mg/l de AIA.

4.4.2 Explantes de yemas axilares

Las plantas que fueron enraizadas en el medio que contenía el 100% y con 1 mg/l de AIA presentó el más alto promedio de longitud de plantas. El número de hojas y el diámetro de seudotallo fueron favorecidos en el medio suplementado por el MS 50% de las sales de consistencia líquida. Los porcentajes de sobrevivencia fueron altos en los diferentes tratamientos con un rango de 96-100% de sobrevivencia (Tabla.20).

Tabla 20. Longitud de planta, número de hojas, diámetro de seudotallo y porcentaje de sobrevivencia en plantas reproducidas de yemas axilares en tres variantes de medio de cultivo. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan. $\alpha = 0.05$.

Variables	Consistencia	Medios de cultivo		
		MS (100% sales)	MS (50% sales)	MS (100% sales) + 1mg/l de AIA
Longitud de planta	Líquida	3.85 b	5.27 ab	4.82 ab
	Sólida	4.22 ab	5.15 ab	5.62 a
Número de hojas	Líquida	2.35 ab	2.70 a	2.55 ab
	Sólida	2.50 ab	2.30 b	2.45 ab
Diámetro de seudotallo	Líquida	0.40 ab	0.47 a	0.42 ab
	Sólida	0.42 ab	0.35 b	0.37 ab
Sobrevivencia	Líquida	96%	96%	100%
	Sólida	100%	96%	96%

En la Figura 8, se aprecian plantas representativas reproducidas a partir de yemas axilares en los diferentes tratamientos del cultivar Blanco, en la fase de aclimatización.

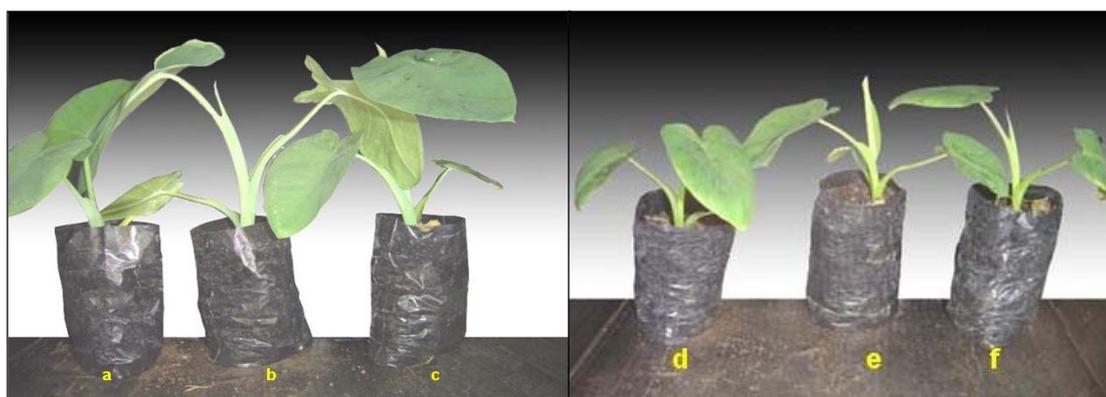


Figura 8. Plantas propagadas de yemas axilares. Fase de aclimatización a los 45 días: Izquierda, plantas previamente enraizadas en medio líquido a) medio 100% sales MS b) Medio al 50% de las sales c) Medio 100% sales más 1 mg/l de AIA. Derecha: plantas previamente enraizadas en medio sólido d) medio 100% sales MS e) Medio al 50% de las sales e) Medio 100% sales más 1 mg/l de AIA.

En la aclimatización de plantas *in vitro* reproducidas por dos tipos de tejidos, no se presentaron diferencias determinantes entre ellos por efecto del medio de cultivo y su consistencia durante la fase de enraizamiento, aunque sí hubo diferencias en porcentaje de sobrevivencia, con la tendencia a una mayor sobrevivencia cuando las plantas aclimatizadas se han desarrollado en medios de consistencia sólida en la fase de enraizamiento.

García *et al.*, (1997), obtuvieron promedios de 2 cm en longitud de planta, con dos hojas activas y un sistema radicular bien formado en un sustrato orgánico conocido como compost.

El cultivar demostró que es una especie que endógenamente tiene un alto nivel de auxinas, teniendo en cuenta que en las fases de establecimiento y de multiplicación los explantes emitieron regularmente buen número de raíces, además presentó la característica de poder adaptarse con facilidad a las condiciones *ex vitro*.

4.5 Número de explantes por contenedor

La densidad y número de explantes en el recipiente de cultivo ha sido poco estudiada y los criterios para establecer la misma han sido tomados a veces de experiencias prácticas, conociendo el comportamiento de especies afines o simplemente se establece una densidad sobre la base de que el explante disponga de una determinada cantidad de medio de cultivos. Considerándose en otros casos el diámetro del recipiente y manejando la misma densidad para todas las especies.

El no valorar experimentalmente lo antes mencionado, puede acarrear problemas; una baja densidad ocasiona pérdidas de espacio y de medio de cultivos, así como la subutilización del recipiente, mientras que a densidades altas ocasiona un crecimiento limitado de los propágulos e insuficiente proliferación, subcultivos más frecuentes, poco desarrollo de los brotes para ser transferidos a la fase de enraizamiento (Pérez Ponce, 1998).

4.5.1 Explantes de yemas terminales

De las variables evaluadas solamente en el promedio de número de hojas de los tres explantes estudiados se presentaron diferencias estadísticas de acuerdo al análisis de rangos múltiples de Duncan - Waller, alcanzándose el mayor promedio de hojas con 4 explantes por contenedor (3.95). El mayor promedio de brotación se logró con 4 explantes por contenedor con promedios de 0.60 brotes (Tabla 21).

Tabla 21. Longitud de plantas, número de hojas, número de raíces, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brote, en plantas obtenidas de yemas terminales. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller. $\alpha = 0.05$

Tratamiento (Número de explantes)	Longitud de plantas	Número de hojas	Número de raíces	Número de brotes	Longitud de brotes	Número hojas/brote.
4	2.50 a	3.95 a	7.05 a	0.60 a	0.36 a	0.70 a
5	2.04 a	3.40 b	5.96 a	0.52 a	0.15 a	0.68 a
6	2.20 a	3.33 b	6.06 a	0.40 a	0.30 a	0.73 a

4.5.2 Explantes de yemas axilares

En las variables evaluadas longitud de plantas, número de hojas, número de raíces, número de brotes y longitud de brotes no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos. Sin embargo, el promedio de brotes axilares (1.32) fue ligeramente mayor con 5 explantes e inferior con 6 explantes con promedios de 0.70 brotes. Solo en la variable número de hojas por brote se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, observándose que con 5 explantes fue mejor estadísticamente que el número de hojas por brotes obtenidos con 6 explantes por frascos (Tabla 22).

Tabla 22. Longitud de plantas, número de hojas, número de raíces, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brote, en plantas obtenidas de yemas axilares. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller. A = 0.05.

Tratamiento (Número de explantes)	Longitud de plantas	Número de hojas	Número de raíces	Número de brotes	Longitud de brotes	Número hojas/brote.
4	1.52 a	4.25 a	2.70 a	1.10 a	0.42 a	1.35 ab
5	1.44 a	3.74 a	3.64 a	1.32 a	0.46 a	2.16 a
6	1.47 a	3.74 a	5.09 a	0.70 a	0.23 a	1.16 b

En las plántulas reproducidas a partir de yemas axilares, el número de raíces numéricamente fue mayor con 6 explantes por frascos con promedios de 5.09 raíces y menor con 4 explantes con promedios de 2.70 raíces, debido posiblemente a que a mayor número de explantes por frascos hay una mayor difusión de auxinas por parte de los explantes.

Diferentes autores reportados por Caldera & López (2002), destacan que cuando se inoculan una mayor densidad de explantes por contenedor se produce una mayor cantidad de brotes o de raíces, debido a que los explantes difunden sustancias como las auxinas y las citoquininas. Estos mismos autores, en plátano, cultivar Enano, obtuvieron mejor brotación axilar con la siembra de 5 y 6 plantas en contenedores de 100 y 200 ml. Evert & Holt (1975), citados por George (1993), observaron que normalmente el crecimiento *in vitro* en contenedores grandes es mejor cuando contienen muchos brotes, porque juntos ayudan a mantener una adecuada humedad relativa dentro del contenedor. En el cultivar Blanco, plantas reproducidas a partir de tejidos de yemas terminales fue menor el porcentaje de brotes con respecto a los obtenidos por yemas axilares, esto se explica debido al efecto de dominancia apical que se ejerce sobre la brotación axilar al producir estos tejidos mayor concentración de auxinas endógenas.

4.6 Inmersión temporal

4.6.1 Explantes de yemas terminales

En los tratamientos con 2 y 3 inmersiones no se presentaron diferencias estadísticas significativas en las variables de longitud de planta, número de raíces y número de brotes. El número de hojas fue significativamente superior con dos inmersiones con un promedio de 3.46 hojas, mientras que con tres inmersiones el promedio de hojas fue de 3.00. Con dos inmersiones se favoreció la tendencia a incrementar el número de hojas y el número de brotes axilares pero disminuyó la emisión de raíces (Tabla 23).

Tabla 23. Longitud de planta, número de hojas, número de raíces y número de brotes en plantas reproducidas de yemas terminales . Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller. $\alpha = 0.05$.

Tratamiento (Número de inmersiones por día)	Variables evaluadas			
	Longitud de planta	Número de hojas	Número de raíces	Número brotes/planta
2	3.14 a	3.46 a	0.50 a	1.63 a
3	2.68 a	3.00 b	0.86 a	1.07 a

Fue evidente el efecto de la inmersión, en el incremento del área foliar, aunque se observó la presencia de síntomas de hiperhidricidad (Figura 9).



Figura 9. Micropropagación del cultivar en recipientes de inmersión temporal automatizada. Arriba: con frecuencia de dos inmersiones por día. Abajo: con frecuencia de tres inmersiones por día. Nótese a la derecha, las diferencias en tamaño de hoja.

4.6.2 Explantes de yemas axilares

En el número de raíces se presentaron diferencias significativas superiores cuando se suministraron tres inmersiones por día. Con dos inmersiones en las plántulas se observó tendencia a favorecer la emisión de hojas y de brotes axilares, y la disminución de la producción de raíces (Tabla 24).

Tabla 24. Longitud de planta, número de hojas, número de raíces y número de brotes en plantas reproducidas de yemas axilares. Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller. $\alpha = 0.05$.

Tratamiento (Número de inmersiones por día)	Variables evaluadas			
	Longitud de planta	Número de hojas	Número de raíces	Número brotes/planta
2	3.18 a	3.36 a	0.33 b	1.63 a
3	3.26 a	2.96 a	1.55 a	0.90 a

Fue evidente que con tres inmersiones se incrementaron el número y la superficie foliar, pero se redujo el promedio de brotación axilar, contrario a lo que sucedió con dos inmersiones. No se alcanzaron los promedios de brotación axilar reportados por Dottin (2000), de 13.80 en el cultivar México 8, debido posiblemente a que se utilizó contenedores de mayor volumen con capacidad para sembrar un mayor número de explantes por contenedor (50 explantes por contenedor) en este estudio se utilizó 10 explantes por contenedor. De acuerdo con George (1993), el volumen de los contenedores pueden algunas veces afectar el crecimiento y morfogénesis *in vitro*. Este efecto puede ser debido a que se acumulan diferentes concentraciones de oxígeno, dióxido de carbono, etileno y otros gases volátiles en el espacio de aire dentro del contenedor.

En los síntomas de hiperhidricidad observados en las plantas que se desarrollaron con frecuencia de tres inmersiones, estas presentaron (hojas grandes, pseudo tallo de menor

longitud y poca producción de raíces), en parte puede atribuirse a la consistencia líquida del medio de cultivo que contribuyó al incremento de la humedad relativa dentro del contenedor. Böttcher (1988), señala que existe una clara conexión entre disponibilidad de agua en el medio, atmósfera del contenedor y la vitrificación y ésta última es siempre mayor en medio líquido que en sólido como lo comprobaron en cultivos como *Betula pendula*.

Otro factor que también favoreció el fenómeno de hiperhidricidad fue el tiempo de inmersión por siete minutos que resultó al parecer excesivo y pudo tener más efecto que el número de inmersiones, por tanto, en futuros estudios será necesario determinar el tiempo de inmersión más adecuado para recipientes con capacidad de 250 ml de medio de cultivo. En la figura 10 se observa el crecimiento de plantas *in vitro* de quequisque en Recipiente de inmersión temporal automatizado (RITA).

De acuerdo con Debergh (1988), el uso de este término vitrificación no se limita a indicar la expresión patológica de plantas fisiológicamente anormales, sino para identificar todas las clases de funcionamientos fisiológicos alterados, debido al estado anormal del agua en el contenedor de cultivo.

Pácques & Boxus (1987), definieron dos tipos de vitrificación según la consistencia y anchura de las hojas: vitrificación “suculenta” y vitrificación “no succulenta”. En el sistema de propagación por inmersión temporal se ajusta al tipo de vitrificación succulenta.



Figura 10. Plántulas de quequisque cultivar Blanco en contendor RITA.

4.7 Embriogénesis somática Indirecta

4.7.1 Fase de iniciación de callos

Concentraciones al 50% y 100% de las sales y la adición 1, 2 y 3 mg/l de 2,4-D favorecieron la formación de callos en porcentajes entre 90 y el 100% de los tejidos, sin emisión de raíces. En los medios que contenían el 50 y 100% de sales con adiciones de 0.2 mg/l de BAP y 2 mg/l de IBA se formaron callos en el 20 y 10% respectivamente. La emisión de raíces solo se observó en el medio que contenía la concentración de las sales al 50% más la adición de BAP e IBA en el 30% de los explantes. En los medios con las sales al 50% más 0.0 Y 3 mg/l de 2,4- D y con las sales al 100% más 3 mg/l de 2,4-D fue mínima la diferenciación de los ápices a plantas (Tabla 25).

Tabla 25. Porcentaje de iniciación de callos, explantes con raíces y formación de plantas a partir de ápices.

Trat. (medios de cultivo)	Concentración de sales MS (%)	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	Variables		
					Formación de callos (%)	Forma ción de plantas	Explantos con raíces (%)
1	50	1.0	0.0	0.0	95±5.00	5.0±5.0	0.0±0.0
2	50	2.0	0.0	0.0	95±5.00	20±9.18	0.0±0.0
3	50	3.0	0.0	0.0	95±5.00	10±6.88	0.0±0.0
4	50	0.0	0.2	2.0	20±9.18	85.7±8.19	30±10.5
5	100	1.0	0.0	0.0	90±6.88	25±9.93	0.0±0.0
6	100	2.0	0.0	0.0	100±0.00	15±8.19	0.0±0.0
7	100	3.0	0.0	0.0	100±0.00	5.0±5.0	0.0±0.0
8	100	0.0	0.2	2.0	10±6.88	95±5.0	0.0±0.0

Medias ± Error estándar

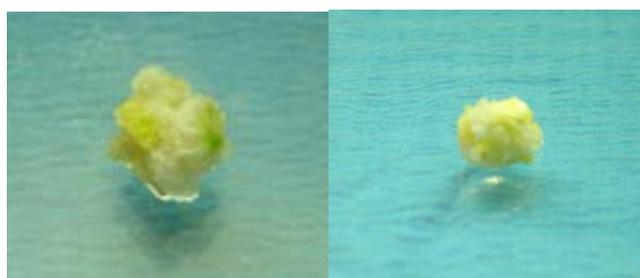


Figura 11. Izquierda y derecha callos friables a los 30 días de permanecer en el medio de cultivo, color amarillo callos friables color crema, callo no friable.

Dottin (2000), empleando ápices como explantes, obtuvo los mejores resultados para la inducción de callo, en el medio MS con 2 mg/l de 2, 4-D, con un promedio de 40% de callos formados. Este resultado se explica tomando en cuenta cuando el explante entra en contacto con el 2, 4-D, este excretan el hidrógeno hacia la pared celular, favoreciendo la descomposición de lípidos y la ruptura de los puentes de hidrógeno, además se observan iones de potasio, provocando disminución del potencial de agua de las células.

Según George (1993), para la formación de embriones somáticos fundamentalmente en los procesos de diferenciación, inducción de callo y la formación de células es necesario altos niveles de auxinas (especialmente 2,4-D), no obstante, para el desarrollo de embriones estos niveles deben disminuir.

De acuerdo con Barceló (2003), la auxina puede provocar el crecimiento de los callos debido al efecto sobre el metabolismo del ARN por la inducción de transcripción de moléculas específicas de ARN mensajero. La respuesta embriogénica del callo depende del genotipo. Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros no responden en el mismo medio (Litz, 1984).

En el proceso de embriogénesis somática el estímulo de la auxina induce alteraciones en el pH del citoplasma y la pared celular, esto ha sido demostrado en zanahoria, donde al trabajar con cultivos con medio con pH 4, se puede iniciar y mantener el estado pre-globular o proembrional sin necesidad de ninguna hormona exógena (Gómez, 1998).

4.7.2 Fase de multiplicación de callos

La tasa de callos escala 1 fue reducida en los tratamientos 1, 3 y 4. En el medio con 2 mg/l de kinetina y 0.2 mg/l de ANA todos los callos sobrevivieron. En el medio con agua de coco al 10% fue mayor la escala 4 de crecimiento con porcentaje del 45 % y la escala 5 fue del 5 %; mientras que en el medio con agua de coco al 5 % los promedios en las escalas 4 y 5 fueron de 25 %. En el medio con 2 mg/l de kinetina más 0.2mg/l de ANA los porcentajes de las escalas fueron de 25 y del 10 % respectivamente; con 2 mg/l de ANA y 2 mg/l de Kinetina, los porcentajes obtenidos en estas dos escalas fueron de 15 y 25 % respectivamente (Tabla 26).

Tabla 26. Porcentaje de formación de callos del cultivar en los diferentes tratamientos de acuerdo a escala de crecimiento propuesta por Santana (1982)

Trat. (medios de cultivo)	Agua de coco (%)	Kine tina (mg/l)	ANA (mg/l)	Escala de crecimiento % de explantos con callos				
				1	2	3	4	5
1	5.0	0.4	0.0	5±5.0	25±9.93	20±9.18	25±9.93	25±9.93
2	10	0.4	0.0	5±5.0	25±9.93	20±9.18	45±11.4	5±5.00
3	0.0	2.0	0.2	0±0.0	30±10.5	35±10.9	25±9.93	10±6.88
4	0.0	2.0	0.2	5±5.0	35±10.9	20±9.18	15±8.19	25±9.93

Medias ± Error estándar

La figura 12 muestra el aspecto de los callos en crecimiento en la fase de multiplicación.

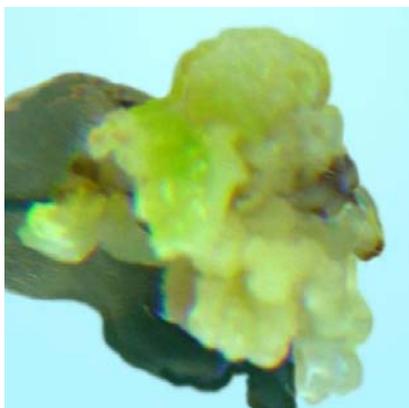


Figura 12. Callos en fase de multiplicación.

En el cultivar Blanco el porcentaje de callos que presentaron un crecimiento del 100% fue reducido, debido posiblemente a lo señalado por Pliego & Barceló (2001), que en las masas de células proembriogénicas la división celular tiene lugar en las regiones más superficiales, mientras que las células centrales entran en fase de senescencia. Los mejores resultados en la escala 5 se obtuvieron en el medio que se adicionó el 5% de agua de coco y en el medio con 2 mg/l tanto de kinetina como de ANA.

Según Roca & Mroginski (1991), el del agua de coco tiene efecto sobre el crecimiento de los callos debido a que contiene auxina, difenilurea, y vitaminas llevando a cabo las reacciones catalíticas en el metabolismo de la célula durante el proceso de embriogénesis.

De acuerdo con Torres & Vásquez (1995), las citoquininas tiene efectos biológicos sobre la inhibición de la oxidación de AIA, y la kinetina bloquea la síntesis de las auxinas.

4.7.3 Fase de formación de embriones

Con 20 y 30 mg/l de AIA los mayores porcentajes de callos con embriones globulares fueron del 70%. No se presentaron diferencias estadísticas significativas en los promedios de número de embriones globulares en los cuatro medios de cultivo, pero con 30 mg/l de AIA con número promedio de 5.25 embriones por callo superó ligeramente a

los promedios obtenidos en los demás tratamientos. En los medios con 0.0, 25 y 30 mg/l de AIA, se incrementó la producción de raíces en un rango del 25 al 30%. Con 20 mg/l de AIA, el número de raíces fue del 5% (Tabla 27).

Tabla 27. Resultado de formación de embriones somáticos en diferentes medios de cultivos.

Tratamientos (medios de cultivo)	AIA (mg/l)	Sacarosa (g/l)	Variables		
			Callos con embriones globulares (%)	Número de embriones globulares	Callos con raíces (%)
1	0.0	50	40±11.2	4.35 a	30±10.5
2	20	50	70±10.9	4.65 a	5±5.00
3	25	50	60±10.9	4.25 a	25±9.93
4	30	50	70±10.5	5.25 a	30±10.5
Medias ± Error estándar					

Los resultados obtenidos no coinciden con los obtenidos por Dottin (2000), en cuanto al número de embriones globulares por callo, con el mejor tratamiento reporta un número promedio de 34.20 por callo, cuando utilizó el medio MS suplementado con 50 g/l de sacarosa y 30 mg/l de AIA. Una de las posibles diferencias en los resultados reportados por Dottin (2000), pudieron haber sido el volumen del callo y el genotipo estudiado.

Nyochemberg & Garton (1998), señalan que la sacarosa influye en el crecimiento y desarrollo del callo con estructuras embriogénicas, evitando la germinación precoz de los embriones somáticos en malanga (*colocasia esculenta* var. *esculenta*). Moller (1998), recomienda que además de la sacarosa sea necesario agregar AIA al medio de cultivo antes de la diferenciación celular. La sacarosa adicionada al medio de cultivo proporciona fuente de energía y tiene además, efecto osmótico (Gilliard, 1999).

El efecto osmótico de la sacarosa en los cultivos embriogénicos está relacionado con un potencial osmótico bajo (altamente negativo) en el medio donde crecen las células, en el cual estas pierden agua y como consecuencia el potencial hídrico disminuye. Esto ocasiona cambios en el metabolismo y las células acumulan altos niveles de prolina (Amrstrong *et al.*, 1995).

Las diferentes formas con que se observaron los embriones para el cultivar se muestran en la figura 13 a y b.

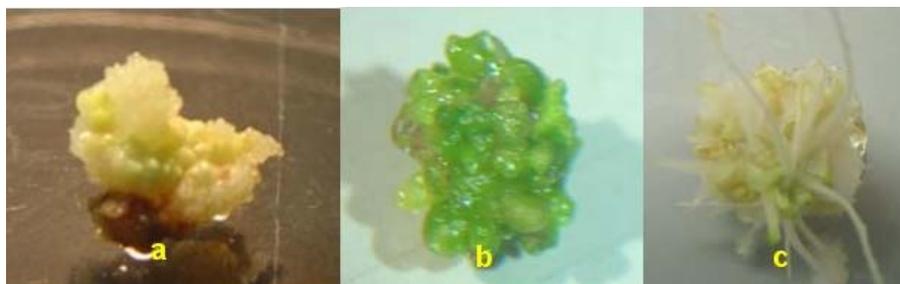


Figura 13. a y b) Embriones globulares c) Callos embriogénicos con Raíces.

4.7.4 Fase de maduración de embriones globulares

La fase de maduración es el período en el desarrollo del embrión somático en el cual ocurre la expansión de la célula y la acumulación de sustancias de reserva (Bewley & Black, 1985).

Los carbohidratos entre ellos la sacarosa en concentraciones de 3-6 % son esenciales, junto a bajas concentraciones de oxígeno en el medio, lo cual permite una total maduración y evita la germinación precoz (Parrot *et al.*, 1998).

Los promedios de embriones globulares producidos en los tres medios no registraron diferencias estadísticas entre sí, aunque los mayores valores se obtuvieron en los medios sin reguladores de crecimiento. En las tres variantes de medio de cultivo los promedios de embriones maduros no se diferenciaron estadísticamente entre sí, pero en el medio con AIA y BAP fueron numéricamente superiores a los demás tratamientos, además en este medio no hubo la emisión de raíces. En el medio sin reguladores de crecimiento la producción de raíces fue del 70% (Tabla 28).

Tabla 28. Resultados de la maduración de embriones globulares por efecto de diferentes medios de cultivos. Letras iguales no difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller con $\alpha = 0.05$

Trat. (medios de cultivo)	2,4-D (mg/l)	AIA (mg/l)	BAP (mg/l)	Variables		
				Número de embriones globulares	Número embriones maduros	Callos con raíces (%)
1	0.0	0.0	0.0	6.15 a	1.40 a	70.00± 10.5
2	0.1	0.0	0.1	6.05 a	1.50 a	20.00±9.18
3	0.0	0.1	0.1	3.15 a	2.75 a	0.00 ±0.00
Medias ± Error estándar						

Dottin (2000), obtuvo los mejores resultados en la maduración de embriones en el medio MS con 30 g/l de sacarosa sin reguladores de crecimiento con promedio del 86.40%.

Los resultados indican que en el medio que no se le adicionó reguladores del crecimiento, se incrementó el número de embriones globulares, pero se redujo la cantidad de embriones maduros. También se comprobó que la combinación de AIA con BAP resultó más efectiva para la maduración de los embriones que la combinación de 2,4-D y BAP.

En el cultivar, la combinación de AIA-BAP no produjo ningún efecto en la inducción de raíces y el 2,4-D combinado con el BAP produjo el 20% de raíces, promedio. Gómez (1988), destaca que medios de cultivo con 2,4-D generan masas proembriogénicas, pero inhiben el desarrollo de los embriones en etapas posteriores a la inducción, más allá de la etapa globular. Shoof (1997), en plátano (*Musa spp.*), encontró que los embriones maduraron sin 2,4-D, germinando el 60% de ellos y con la adición de 2,4-D, la germinación se redujo al 15%.

De acuerdo a estos resultados parece haber coincidencia con Dublín (1991) y Yeung (1995), quienes afirman que el medio de cultivo sin 2,4-D, contribuye a la expansión celular y la acumulación de sustancias de reserva como proteínas, lípidos y almidón en el embrión diferenciado.

4.7.5 Germinación de embriones

El porcentaje de plantas que se formaron a partir de embriones globulares fue alto en las cuatro variantes de medios de cultivos. Sin adición de BAP la formación de plantas fue del 100%, pero el número promedio de plantas fue inferior al obtenido en los otros tratamientos, aunque solo fue inferior estadísticamente al promedio de 3.95 alcanzado en el medio que contenía 0.2 mg/l de BAP (Tabla 29).

Tabla 29. Porcentaje de plantas germinadas a partir de embriones globulares en diferentes medios de cultivos. Letras iguales no difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan - Waller con $\alpha = 0.05$.

Tratamientos (medios de cultivo)	BAP (mg/l)	Sacarosa g/l	Variables	
			Plantas germinadas (%)	Número de plantas
1	0.0	30.0	100±0.00	2.35 b
2	0.1	30.0	90±6.88	2.50 b
3	0.2	30.0	95±5.00	3.95 a
4	0.3	30.0	95±5.00	2.50 b

Medias ± Error estándar

En la figura 14 se muestra plantas formadas a partir de embriones globulares.



Figura 14. Proceso de germinación de embriones.

Liu (1994), dice que la incorporación de citoquininas suelen ser determinantes en el proceso de germinación de embriones; durante la fase de histodiferenciación compensa el efecto negativo inducido por la auxina sobre el desarrollo de los meristemos.

Ndoumou *et al.*, (1995), lograron la inducción de callos en el medio MS con 2 mg/l de IBA y 0.025 mg/l de BAP y la germinación en el MS suplementado con 2.25 mg/l de BAP y 0.02 mg/l de IBA.

4.7.6 Fase de enraizamiento

Según Jiménez (1995), las vitroplantas procedentes de los medios de cultivos utilizando las mayores concentraciones de sacarosa, presentan una mayor sobrevivencia al ser sembrada en la fase de aclimatización, tal vez debido a una mejor adaptación para soportar el estrés hídrico, motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unidos a una mejor constitución morfológica de las mismas.

En el estudio, las plantas enraizadas no presentaron variaciones genética, probablemente debido al buen estado de las fuentes iniciales y de multiplicación y el número adecuado de subcultivos utilizados. En la tabla 30 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las variables evaluadas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en la fase de enraizamiento del proceso de organogénesis directa, evaluando las mismas variables.

Tabla 30. Resultados en promedios por planta, a las cuatro semanas de enraizadas.

Variables	Promedios
Longitud de planta (cm)	2.39
Número de hojas	2.55
Número de raíces	8.91
Número de brotes	3.12

4.7.7 Fase de Aclimatización

Las plantas aclimatizadas provenientes de la fase de enraizamiento mostraron una sobrevivencia de un 95%. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 31.

Tabla 31. Resultados en promedio por planta, a las cuatro semanas de aclimatizadas.

Variables	Promedios
Longitud de planta (cm)	5.01
Número de hojas	3.80
Diámetro de seudotallo (mm)	5.37
Porcentaje de sobrevivencia (%)	95

En las fases de enraizamiento y de aclimatización no se observaron variantes genéticas reportadas por muchos autores, elemento importante porque con el proceso de embriogénesis se puede potenciar el empleo de técnicas de inmersión temporal para incrementar los coeficientes de multiplicación, que superan a la micropropagación utilizando medios sólidos o líquidos. Otra la importancia que adquiere la embriogénesis somática, es el empleo de los tejidos no diferenciados en la transformación genética de este cultivo. En la figura 15 se aprecian las plantas en la fase de aclimatización.



Figura 15. Plantas con 30 días de aclimatización.

V. CONCLUSIONES

Los resultados alcanzados en el presente trabajo permitieron las siguientes conclusiones:

5.1. Organogénesis directa

1. Estudiando las diferentes fases se observó respuestas diferentes en cada una de las fuentes de procedencia de los explantes, así como en los medios de cultivo utilizados.
2. En la fase de establecimiento a los 30 y 45 días con ápices extraídos de yemas terminales, se presentaron mayores porcentajes de plantas en los medios suplementados con 0.0, 0.5 y 1 mg/l de AIA combinado con 1 mg/l de BAP; a los 60 días la formación de plantas fue del 100% en los medios con 0.0, 0.5 y 1 mg/l de AIA combinados con 1 y 2 mg/l de BAP. Utilizando yemas axilares la formación de plantas a los 30 días se favoreció en el medio que contenía 0.0, 0.5 y 1 mg/l de AIA con 1 mg/l de BAP, no obstante a los 45 y 60 días se presentó con 1 y 2 mg/l de BAP con o sin AIA.
3. Los mayores promedios de brotes, en el primer subcultivo, con plantas reproducidas a partir de yemas terminales se presentaron en los medios con niveles de 0.0, 0.25 y 0.50 mg/l de AIA con adición de 3 mg/l de BAP; en el segundo subcultivo no se observaron diferencias estadísticas con respecto al número de brotes en los medios que contenían BAP. En el tercer subcultivo con 2 y 3 mg/l de BAP fue mejor la brotación axilar. A partir de yemas axilares, en el primer y tercer subcultivo se presentó la mayor brotación, en los medios que se les adicionaron 0.5 mg/l de AIA con 2 mg/l de BAP y 0.0 mg/l de AIA mas 3mg/l de BAP; no obstante en el segundo subcultivo la brotación fue mayor en el medio con 0.5 mg/l de AIA y 3 mg/l de BAP.
4. La emisión de raíces fue mayor utilizando ápices extraídos de yemas terminales con las sales reducidas en su concentración al 50% y en el medio líquido con 1

mg/l de AIA. Con plantas reproducidas a partir de yemas axilares la producción de raíces fue mayor en el medio de consistencia sólida con 100% de sales más 1mg/l de AIA y en el medio líquido con sales al 100%.

5. En la fase de aclimatización utilizando plantas provenientes de yemas terminales y previamente enraizadas en medios sólidos con las sales al 50 y 100 % de su concentración y en el medio líquido con las sales al 100% más 1 mg/l de AIA la sobrevivencia fue del 100%, utilizando plantas provenientes de yemas axilares; la sobrevivencia fue del 100 % tanto en medio líquido con las sales al 100% más 1 mg/l de AIA como en el medio sólido con las sales al 100 %.
6. En el número de explantes por frasco utilizando yemas terminales la mayor brotación se presentó con 4 explantes y con yemas axilares fue con 5 explantes.
7. En el cultivar con plantas regeneradas a partir de yemas terminales en el sistema de inmersión temporal automatizado (RITA), con frecuencia de tres inmersiones por día cada una durante siete minutos, fue mayor el promedio de brotación axilar pero propició el efecto de hiperhidricidad principalmente en las hojas de las plantas. Las plantas obtenidas a partir de yemas axilares la brotación axilar fue mayor utilizando frecuencia de dos inmersiones por día, siendo menor el efecto de hiperhidricidad.

5.2. Embriogénesis somática indirecta

1. En el cultivar, la relación mayor porcentaje de formación de callos y menor formación de plantas se obtuvo en el medio constituido por las sales MS al 100 % con 3 mg/l de 2,4-D.
2. En la fase de multiplicación fue posible obtener altos porcentajes de callos en crecimiento en el medio que se le adiciono 5% de agua de coco y 0.4 mg/l de Kinetina.

3. Se comprobó que el mayor porcentaje de embriones globulares se obtuvo en el medio con 30mg/l de AIA, con el 70% respectivamente y mayor número de embriones globulares con promedios de 5.25.
4. El mayor promedio de embriones globulares maduros se formaron en el medio con 0.1mg/l de AIA y BAP.
5. En el cultivar el mayor porcentaje de embriones germinales se presentó en el medio sin regulador de crecimiento, y el número de plantas formadas fue mayor en el medio con 0.2 mg/l de AIA.
6. En las fases de enraizamiento y aclimatización de las plantas los resultados obtenidos fueron muy similares a los de organogénesis directa, con un promedio de raíces de 8.91, y 95% de sobrevivencia no presentándose variación genética en las plantas.

VI. RECOMENDACIONES

Basados en los resultados obtenidos y las conclusiones expresadas se considera correcto recomendar:

1. En el cultivar de quequisque Blanco cuando se utilicen ápices extraído de yemas terminales como de axilares durante las fases de establecimiento y de multiplicación es necesaria la adición de BAP solo o en combinación con AIA.
2. Tomando en cuenta la dinámica de crecimiento observada en la fase de establecimiento los ápices extraídos tanto de yemas terminales como de axilares, pueden ser divididos longitudinalmente en dos partes y transferidos a un medio de multiplicación entre las 2 y 3 semanas de establecidos.
3. En los recipientes de inmersión temporal automatizados (RITA), es conveniente realizar estudios que permitan controlar los efectos de hiperhidricidad en las plantas, considerando el tiempo y la frecuencia de inmersión, así como el volumen del contenedor a utilizar.
4. Es conveniente realizar estudios en el cual se utilicen contenedores de diferentes volúmenes tomando en cuenta las concentraciones de auxinas endógenas presente en los explantes al ser inoculados con el objetivo de poder alcanzar el mayor número de brotes por explantes utilizados por contenedor.
5. Realizar estudios posteriores potencializando el proceso de embriogénesis somática utilizando recipientes de inmersión temporal automatizada (RITA).
6. Realizar estudios donde se evalúen el estado sanitario de la plantas in vitro (proveniente de organogénesis directa y embriogénesis indirecta) sometiénolas a diferentes pruebas de detección e identificación de virus utilizando diferentes técnicas entre las que se reportan la microscopía electrónica, las moleculares y las técnicas enzimáticas, donde el test o prueba ELISA es la de mayor uso y fácil adquisición.

VII. BIBLIOGRAFIA

- Agramonte, D., Jiménez, F. & Dita, R (1998)** Aclimatización, Propagación y Mejora Genética de plantas por biotecnología. Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba: Pg 193-206.
- Altamirano A M, Acuña R E (2000)** Comportamiento en condiciones de Masaya de plantas de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schot) en la comunidad Masaya, obtenidas de tres técnicas de propagación. Pg 35. Trabajo de tesis.
- Armstrong C & E. Green (1995)** Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline, 164: 207-214.
- Bancroft, R. D & F. D. McDonald (1998)** Plant Tissue Culture Manual. CARADI, Cave Hill Campus, P.O Box 64, Barbados, 1-6.
- Barceló, A (2003)** Micropropagación de plantas leñosas. En: Transformación y regeneración de plantas. III Maestría en Biotecnología de Plantas. Universidad Nacional de Andalucía, Sede La Rábida, España. 52 pág.
- Berlyn, GP; Anorvo, AO y Beck, RC (1990)** Optical techniques to measure genetic instability in cell and tissue cultures: Biotechnology in Agriculture and forestry 2:202- 223
- Bewley, J & Black, M (1985)** Seed physiology of development and germination. Plenum, New York. p .101.
- Blanco, M (1992)** Raíces y tubérculos. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. P. 81 - 125.
- Blanco, M (1987)** Raíces y tubérculos. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias (ISCA). Managua, Nicaragua. 112 p.
- Bottcher (1988)** Induction and reversion of vitrification of plants cultured in vitro. *Plant. 72*, 560-564.
- Caldera, L.A & López, J.F (2002)** Mejoramiento de la eficiencia de la propagación in Vitro de plátano (*Musa AAB* cv. Enano). Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. 41 p.
- CENAGRO (2001)** III Censo Nacional Agropecuario.
- Davila Villegas, M; Varela Torres, D; Saavedra M, D (2000)** Cultivo del quequisque. Eds. H Obregón O. Managua, Nicaragua. INTA. 23p. (Guía Tecnológica 24.).

- Debergh, P. C & L. J Maene (1981)** A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort* 14:335-345.
- Debergh, P. C (1988)** Micropropagation of wody species-state of the art on in vitro aspects. *Acta Hort.* 227, 287-295.
- Debergh, P. L & R. H. Zimmerman (1991)** Micropropagation technology and Application. Kluwer Academia Publishers. Printed in Netherlands. P – 473.
- Dottin M P (2000)** Propagación in vitro de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Tesis de doctorado. Universidad Central de las Villas. UCLV – Cuba.
- Dublín, P (1991)** Multiplicación vegetativa de café y cacao. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Roca W.M y Mroginski,L.A, eds,26:278-619.
- Escalona, M, J. C. Lorenzo, B. Gonzalez & Ddesjardins y C.G. Borroto, (1999)** pineaplee (*Ananas comosus* (L) Merr). Micropropagacion in temporary immersion system. *Plant Cell Reports*.
- Escalona, M (1999)** Tesis para optar por el grado científico de doctor en ciencias Agrícolas, Universidad de ciego de Ávila, Centro de Bioplasmas de Ciego de Ávila, 94 p.
- Evans, D. A; J. E. Bravo (1985)** Phenotypic and genotypic stability of tissue culture plant. En: *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops.* Zimmerman R.H. (Ed): 73-91.
- Evans, D. A; Bravo, J. E (1986)** Phenotypic and genotypic stability of tissue culture plant. Ed. RH Zimmerman. *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops.* P. 73-91.
- Evans, D. A (1989)** Somaclonal variation – genetic basis and breeding application. *Elsevier Science* 5(2): 46- 50.
- Evert, D. R & Holt M. A (1975)** Asetic culture of chrysanths in the plant propagation class. *Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc.* 25, 444-447.
- Fujimura, T. & Komamine, A (1980)** The serial observation of Embryogénesis in a carrot cell suspensión culture. *New Physiol.* 64p. 162- 164.
- García M (1997)** Tecnología para la micropropagación de la malanga: una solución al rescate de este cultivo en Cuba, *BIOVEGE' 97*, Ciego de Ávila, libro de resúmenes, Cuba.

- García, M (1999)** Tecnología para la micropropagación de la malanga: una solución al rescate de este cultivo en Cuba. Libro de resúmenes BIOVEG-97. Ciego de Ávila, Cuba.
- George E (1993)** Plant propagation by tissue culture part 1. The technology. (Ed) Exegetics Limited. Edington, Wilts, Inglaterra, 9 – 65.
- Gomez L, Monge M, Valverde R, Arias O, Thorpe T (1989)** Micropropagación de tres aráceas comestibles libres de virus. Turrialba 39(2). Diario la Prensa.
- Gómez L (1991)** Establecimiento y multiplicación *in vitro* de cuatro genotipos de ñampi (*Colocasia esculenta* variedad antioquorum). 65 p.
- Gomez, K (1998)** Embriogénesis somática. En: propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología (ed) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba, pp. 57-79.
- Gilliard, T (1999)** Embriogénesis somática en medios líquidos en el cultivar híbrido FHIA- (AAAB). Tesis de Maestría, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba. 70 pág.
- Gupta, P.P (1985)** Plant regeneration and variabilities from tissue culture of cocoyam (*X. sagittifolium*) and (*X. violaceum*). Plant Cell Report 4:88-91.
- Hartman, R. D (1974)** Dasheen mosaic virus and other phytopathogens eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture of shoot tips. Phytopathology. 64: 237-240.
- Hartman, H & Kester, D (1994)** Propagación de plantas: Principios y prácticas. Ed. Continental, VI impresión. México: pp 220-235.
- INTA (2000) Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria.** El cultivo del quequisque. Guía tecnológica, Managua, Nicaragua, 25 pág.
- Jackson G V, Ball E A, Arpitti J (1977)** Tissue culture of Taro, (*Colocasia esculenta* (L) Schoot.) Journal of the Horticultural Science. 52: 373- 382.
- Jiménez G E (1995)** Producción *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum spp* híbrido). Tesis de doctorado. Instituto de biotecnología de las plantas, Universidad Central de las Villas, Santa Clara. 99p.
- Jiménez, G. E (1998)** Propagación y Mejora Genética de plantas por biotecnología. En Cultivo de ápices y meristemas. (ed) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba: pp 45-46.
- Krikorian, A. D (1991)** Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivo *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. (Eds) W. M. Roca, Mroginski. Cali, Colombia: pp 314-338.

- Larkin, P. J & Scowcroft, WR (1981)** Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60: 197-214.
- Lindsey, K. & Jones, M.G.K (1992)** *Biología Vegetal Agrícola*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 276 p.
- Litz & Jarret R L (1991)** Regeneración de las plantas en el cultivo de tejidos embriogénesis somática y organogénesis. 143 – 172 p.
- Litz, R. E (1984)** In vitro somatic Embriogénesis from callus of jaboticaba. *Myrciaria, Califlora. Hort Science*. 19. 62-64.
- Liu, W (1994)** Expressions of desiccation – induced – lipoxygenase genes during the transition from the maturation to the Phases tanniasomatic embrios, *planta* 194, 69- 76.
- López Zada M, Vasquez Becalli E, Lopez Fletes R (1995)** Raíces y Tubérculos eds. RM, Ojeda González; L J, Mora Llanos. Cd. La Habana. Pueblo y educación, p. 98 – 221.
- Merkle, S.; Parrot W. & Flinn, B (1966)** Morphogenic aspects of somatic embriogénesis. In: *In vitro embriogénesis in plant*. (eds) Thorpe. T. pp 155 203.
- Merkle, S (1996)** Morphogenic aspects of somatic Embriogénesis. Thorpe, T. *In vitro Embriogénesis in plants*. P. 155-203
- Moller E T (1998)** Variation in tissue culture – derived rice plant. *Thear appl bent*, 80: 673 – 679.
- Monge M, Arias O, Ramirez P (1987)** Obtención de plantas de Tiquisque blanco, morado y ñampi libres de virus promedio del cultivo in vitro de ápices. *Agronomía Costarricense* 11 (1) 71 – 79.
- Mroginski L A, Roca M V (1991)** Cultivo de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). N° 151. Pg. 674.
- Murashige T & F Skoog (1962)** A revised medium for rapid growth and biossaya with Tobago tissue culture, *Plant Physiology*, 15: 473 – 497.
- Murashige, T (1974)** Plant propagation tthrough tissue culture. *Ann. Rev. Plant physiol*. 25: 135 – 166.
- Ndoumou N C, Chase A R, Stall J B (1995)** Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological and fatty acid analysis. 82: 754 – 759.

- Nguyen T Q, Nguyen V U (1987)** Aroids propagation by tissue culture: Shoot tip culture and propagation of *Xanthosoma violaceum*. Hortscience 22 (4): 671 – 672.
- Nyland G (1968)** Development and maintenacnce of virus- frre propagating material. Proceedings of the International Plant Propagators Society Annual Meeting.
- Nyochembeng, L. & Garton, S (1998)** Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53:127-134.
- Nyochemberg H & T Garton (1998)** Callus growth and plantlet regeneration in Taro, *Colocasia var. esculenta* (L). Schott (Araceae) Annals of Botany 69. 317 – 323.
- Onwueme I C, Charles WB (1994)** Tropical root and tuber crops. Production,perspectives and future prospects. Plant production and protection peper. 126. Food and Agriculture Organization of the United Nations p. 55. Rome.
- Orellana, P (1994)** Tecnología para la micropropagación in vitro de clones de *Mussa* spp. Tesis en opción al grado científico de Doctor en ciencias agrícola. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba, 96.
- Orellana, P (1998)** Introducción a la Propagación masiva. En Propagación y Mejora Genética de las plantas por biotecnología (e d) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba: p 151-178.
- Parrot, W., Dryden, G., Vogt,; Hidebrand,D, Collins, G. & Williams, E (1998)** Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. In vitro Cell. Dev. Biol. 24.p.817.
- Paques M; Boxus P. H; & Dulos M (1987)** Vitrification: and induceable and reversible phenomenon. Acta Horta. 212: 253-258.
- Pérez J N (1998)** Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Cultivo de ápices y meristemas. Vo. 1. pg.: 143.
- Pérez Ponce, J.N (1998)** Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología: Propagación vía organogénesis. Santa Clara, Cuba. IBP. pp. 162-163
- Pérez Ponce, J.N (1998)** Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología: Mutagenesis in Vitro. Santa Clara, Cuba. IBP. p. 297 - 326
- Pliego, F. & A. Barceló (2001)** Morfogénesis *in vitro*. En: Introducción a la Biotecnología Vegetal. Métodos y Aplicaciones. (eds) J. L. Caballero., V. Valpuesta y J. Muñoz. Córdoba, España: pp: 233-242. Córdoba, España: Pp 233 - 242.

- Rancillac, M; J. G. Nourrissean; C. Nabatel & P. Roudillac (1987)** influence de la multiplication *in vitro* sur le comportement du plant fraiser en france. Acta Hort. 212: 55-59
- Redway, F (1993)** Proceeding caribbean regional Workshop on tropical root crops. Jamaica, p 99-104.
- Roca, W.M & Mrogrinsky L.A (1993)** Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. En: Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Editores Técnicos, CIAT, Colombia, 19- 40.
- Santana, N (1982)** Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum sp.*) *in vitro*. Cultivo de tropicales. Vol.4, No 3.
- Staritsky G (1980)** *In vitro* storage of aroid germoplasm. Plants Genetics Resources Newslatrr. 42: 25-27.
- Swartz, HJ (1991)** Micropropagation technology and application : post culture behavior, Eds. PC Debergh; RH Zimmerman. Netherlands. Kluwer Academic p. 95- 122.
- Szabados, L., Mroginski & Roca (1993)** Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. En: Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. (eds) Roca, W. y Mroginisk, L. Cali, Colombia. 8:173-210.
- Schoof, H (1997)** The origin of embryogenic cells in *Musa*. Catholic University of Leuven, Belgium .98 p.
- Smith, M. K & Drew, R. A (1990)** Current applications of tissue culture in plant propagation and Imrpovement. Aust. Journal Plant Physiol. 17: 269 -289.
- Skoog, F. & C.O. Miller (1957)** Chemical regulation of grown and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-131.
- Teisson, C. & Alvard, D (1994)** VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. pp S2-2.
- Thorpe, T A (1980)** Organogénesis *in vitro*. Structural, physiological and biochemical aspects. International. Review of cytology, supplement 11A: 71-111
- Thorpe. T.A (1991)** Establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga (*Xanthosoma ssp.*). (ed) Agronomía costarricense : pp 123-128.

- Tisserat; B; Esan, E. & Murashige, T (1979)** Somatic Embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev.1.p 1-78.
- Tortosa , J. A (1990)** La turba su caracterización física y química, evaluación para cultivo en contenedor. Revista Agrícola Vergel 106: 777- 783.
- Torrez, G. S, E. Vazquez (1995)** Fisiología Vegetal. Editorial pueblo y Educación, Plaza, Ciudad de la Habana, 19 – 37: 315- 373.
- Villalobos, V. M., Mejía, J. M & Escobar, H. A (1991)** Micropropagación de opuntias y agaves. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones (eds) Roca. W y Mrogiński, Calí colombia: pp 643 - 662.
- Yeung, E.C (1995)** Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: In vitro embryogenesis in plants . T. A Thorpe (ed). London: Kluwer Academic Publishers, Correct. 247-253.

VIII Anexos.

Anexo 1. Laboratorio de cultivo de tejido del Programa Recursos Genéticos (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria.



Anexo 2. Preparación del material de siembra.



Anexo 3. Desinfección del material de siembra.



Anexo 4. Fases de propagación in Vitro en quequisque.

a- Fases de establecimiento.



b- Fases de multiplicación.



d- Fase de aclimatización.



c- Fase de enraizamiento.



Anexo 5. Composición del medio base MS (1962)

Macroelementos MS	mg/l
NH ₄ NO ₃	1,650.00
KNO ₃	1,900.00
CaCl ₂ .2H ₂ O	440.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00
KH ₂ PO ₄	170.00
Microelementos MS	mg/l
MnSO ₄ .H ₂ O	16.90
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025
Fe EDTA	mg/l
FeSO ₄ .7 H ₂ O	27.80
Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	37.30
Compuestos orgánicos	mg/l
Acido nicotínico	0.50
Pirodoxina HCl	0.50
Tiamina HCl	0.10
Glicina	2.00
Myo-inositol	100.00
Agente gelificante	g/l
Agar (Phytigel)	3.00
Sacarosa	30.00
pH del medio	5.8