



“Por un Desarrollo Agrario  
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

TRABAJO DE GRADUACIÓN

TÍTULO

**INDUCCIÓN, MULTIPLICACIÓN DE CALLOS,  
REGENERACIÓN DE PLANTAS Y VARIACIÓN  
SOMACLONAL DE LAS VITROPLANTAS EN  
CINCO CULTIVARES DE QUEQUISQUE  
(*Xanthosoma* spp.)**

AUTOR:

Br. HEIDY GUADALUPE COREA NARVÁEZ

ASESORES:

Dr. GUILLERMO REYES CASTRO  
Ing. Agr. ENA MABEL RIVERS CARCACHE

MANAGUA, NOVIEMBRE 2007

## **Dedicatoria**

A mis padres por su apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera aún en condiciones difíciles y por seguir apoyándome en el proceso de mi tesis y por que sé que seguirán apoyándome todo el tiempo.

## **Agradecimientos**

A mis padres Jazmina Narváez y Julio Corea por su apoyo económico y por la protección que me han brindado.

A mis asesores: Ing. Ena Rivers Carcache que siempre estuvo a mi lado enseñándome y sobre todo ayudándome en momentos de duro trabajo, porque ya necesita lentes producto del trabajo realizado en el laboratorio y porque siempre siempre me ayudo mucho.

Al Doctorchhh Guillermo Reyes quien siempre me brindo sus conocimientos y me impulso a realizar un mejor trabajo, por su amistad y porque ahora tiene más canas después de habernos tenido como tesisistas incluida Lacecinic.

A mi amiga Argelia Guerrero por que siempre que tuvo la oportunidad de ayudarme lo hizo y sabía que podía contar con ella.

A Rosario García (Chayo), Lidia Florián, Cecilia García (Lacecinic) y Javier Gutiérrez (Javierito) quienes me auxiliaron cuando necesitaba de ayuda, gracias porque aunque yo no lo pidiera sabía que podía contar con ellos.

Al Proyecto de apoyo al consejo de investigación (PACI-UNA) por el financiamiento del estudio.

## ÍNDICE GENERAL

<b>CONTENIDO</b>		<b>Página</b>
Índice general		i
Índice de cuadros		li
Índice de figuras		lii
Índice de anexos		iv
Resumen		vi
<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
	Objetivo general	3
	Objetivos específicos	3
<b>II</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	4
	2.1 Material vegetal	4
	2.2 Medidas de asepsia	4
	2.3 Inducción de callos	5
	2.3.1 Regeneración de plantas a partir de callos inducidos	5
	2.4 Multiplicación de callos	5
	2.4.1 Regeneración de plantas a partir de callos multiplicados	6
	2.5 Aclimatización de plantas	6
	2.6 Variables evaluadas	7
	2.6.1 Inducción de callos	7
	2.6.2 Multiplicación de callos	7
	2.6.3 Regeneración de plantas	8
	2.6.4 Aclimatización de plantas	8
	2.6.4.1 Variables morfológicas	9
<b>III</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	10
	3.1. Inducción de callos	10
	3.2. Regeneración de plantas a partir de callos inducidos	10
	3.3 Multiplicación de callos	12
	3.3.1 Supervivencia	12
	3.3.2 Consistencia de los callos	13
	3.3.3 Tamaño de los callos	13
	3.3.4 Estructuras desarrolladas	15
	3.4 Regeneración de plantas a partir de callos multiplicados	15
	3.5 Aclimatización de plantas	16
<b>IV</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	24
<b>V</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	25
<b>VI</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	26
<b>VII</b>	<b>ANEXOS</b>	30

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Cultivares de quequisque utilizados en el estudio.	4
2	Medios de cultivo empleados en la multiplicación de callos	6
3	Fases, medios de cultivo y duración	7
4	Variables de multiplicación de callos	7
5	Descripción de las variables evaluadas en la regeneración de plantas	8
6	Estructuras desarrolladas de los callos inducidos en la fase de regeneración de plantas (segundo subcultivo) en el medio MS sin reguladores de crecimiento a los 10 y 30 días en Bco, CS, SR, LE y TC	12
7	Estructuras de desarrollo de los callos a los 65 días en la etapa de multiplicación en los medios de cultivo II, III, IV y V en los cultivares Bco, CS, SR, LE, TC.	15
8	Número de plantas aclimatadas por medio de cultivo (I, II, III, IV y V) de los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC.	16
9	Variaciones somaclonales (%) observadas a los 60 días después del establecimiento de los cultivares en el sombreadero	17
10	Promedios de variables morfológicas en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC a los 60 días después del establecimiento en sombreadero	18

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Tamaño promedio de callos (cm) de los cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma</i> spp.) Bco, CS, SR, LE, TC en el medio de cultivo MS+ 3 mg l <sup>-1</sup> 2,4-D a los 90 días.	10
2	Callos friables CS 80 días	10
3	Estructuras desarrolladas de los callos inducidos en la fase de regeneración de plantas en el medio MS sin reguladores de crecimiento a los 15, 45 y 80 días en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC	11
4	Estructuras de crecimiento desarrolladas: a) multiyemas, b) plantas con raíces y c) callo con raíz	11
5	Porcentaje de sobrevivencia de callos multiplicados en los medios de cultivo II, III, IV y V en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC a los 65 días.	12
6	Porcentaje de callos friables y acuosos obtenidos en los cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma</i> spp.) Bco, CS, SR, LE y TC en los medios de cultivo II, III, IV y V a los 65 días	13
7	Tamaño promedio (cm) de callos de los cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma</i> spp.) Bco, CS, SR, LE y TC en cuatro medios de cultivo II, III, IV y V a los 65 días	14
8	Callos en crecimiento, multiyemas, plantas y callos sin crecimiento registradas a los 50 días por los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC que fueron multiplicados en los medios de cultivo II, III, IV y V establecidos en el medio MS sin reguladores de crecimiento	16
9	Plantas los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC. provenientes de callos inducidos y callos multiplicados en etapa de aclimatización	17
10	Variaciones en forma de las hojas: a) Hoja redonda; b) hoja en forma de basto; c) hoja con borde redondeado; d) hoja alargada; e) hoja sin lóbulo; f) hoja con punta enrollada; g) decoloración en la hoja; h) deformación en el lóbulo.	18

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexos</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Anexo 1	Metodología para la preparación del extracto de quequisque (Yam et al, 1990)	30
Anexo 2.	Análisis estadístico de los datos del tamaño de callos de los cultivares de quequisque Bco, CS, SR, LE y TC por cultivar y en cada medio de cultivo.	31
Cuadro 11	Datos numéricos de figura 3 estructuras desarrolladas de los callos inducidos en la fase de regeneración de plantas en el medio MS sin reguladores de crecimiento a los 15, 45 y 80 días en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC	32
Cuadro 12	Datos numéricos de la figura 5 porcentaje de sobrevivencia de callos multiplicados en los medios de cultivo II, III, IV y V en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC a los 65 días	32
Cuadro 13	Datos numéricos de la figura 6 porcentaje de callos friables y acuosos obtenidos en los cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma</i> spp.) Bco, CS, SR, LE y TC en los medios de cultivo II, III, IV y V a los 65 días	32
Cuadro 14	Datos numéricos de la figura 7 tamaño promedio (cm) de callos de los cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma</i> spp.) Bco, CS, SR, LE y TC en cuatro medios de cultivo II, III, IV y V.	32
Cuadro 15	Datos numéricos de la figura 8 callos en crecimiento, multiyemas, plantas y callos sin crecimiento registradas a los 50 días en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC que fueron multiplicados en los medios de cultivos II, III, IV y V establecidos en el medio MS sin reguladores de crecimiento	33
Figura 11	a) Callo friable; b) callos acuosos	33
Figura 12	Callos friables del cultivar casitas en el medio de multiplicación IV a los 65 días	33
Figura 13	Plantas, multiyemas y callo con raíz de LE-V a los 65 días	33
Figura 14	Hojas con forma de basto	34
Figura 15	Hojas redondeadas	34

Figura 16	Hojas alargadas	34
Figura 17	Hojas sin lóbulo	35
Figura 18	a) y b) Borde rugoso; c) decoloración; d), e), f), g), h) e i) deformación en el lóbulo; j) punta enrollada	35

## RESUMEN

Se evaluó la variación somaclonal de plantas de los cultivares Blanco (Bco), Casitas (CS), San Ramón (SR), La Escalera (LE) y Ticuantepe (TC) regeneradas del cultivo de callos y callos multiplicados. El medio MS + 3 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D se utilizó para inducir callos. 50% de los callos regeneraron plantas en el medio MS simple (I). El 50% restante fueron multiplicados en 4 medios (II, III, IV y V) y luego colocados en el medio MS simple para regenerar plantas. Los cultivares produjeron 100% de callos en el medio inductor y regeneraron 100-260 plantas en los callos inducidos. Los medios IV y V registraron mayores valores de callos friables y grandes. Los cultivares produjeron multiyemas en casi todos los medios; puntos de crecimiento en los medios IV y V y plantas en el medio V. Los callos multiplicados del medio V regeneraron plantas en todos los cultivares, los del medio IV en tres. Los callos multiplicados en los medios II y III no regeneraron plantas, a excepción de Bco que regeneró (10) en el medio II. Las plantas en sombreadero provenían de los medios I, IV y V. LE regeneró y aclimatizó 839 plantas, Bco 586, TC 300, CS 272 y SR 200. Los cultivares excepto Bco presentaron hojas redondeadas, en forma de basto, con borde rugoso, alargada, decoloración, punta enrollada, lóbulo deforme y pecíolo alargado. SR-I presentó 17.4% de variaciones, LE-IV 13.9% y TC-I 10.9%.

**Palabras claves:** *Xanthosoma*, inducción y multiplicación de callos, variación somaclonal.

## I. INTRODUCCIÓN

El quequisque (*Xanthosoma* spp.), miembro de la familia *Araceae* y nativo de América tropical y subtropical, ha sido cultivado desde la época precolombina (López *et al.*, 1995). La producción de quequisque es casi exclusivamente usada para el consumo humano (Onwueme y Charles, 1994), puesto que sus cormos y/ o cormelos se consumen cocidos o fritos constituyendo un excelente alimento rico en proteínas y carbohidratos (INTA, 2000). La demanda de este rubro en mercados internacionales lo convierte en un producto no tradicional de exportación con muchas expectativas económicas dentro de las familias productoras, especialmente aquellas que viven en las zonas del trópico húmedo nicaragüense (Nueva Guinea, San Carlos y El Rama), donde se cultiva de manera artesanal en áreas pequeñas de 0.35 a 1.4 ha (INTA, 2000). El quequisque se exporta en su mayoría a Puerto Rico, Estados Unidos y Costa Rica (MIFIC, 2005) pero también a Panamá, Liberia y Bélgica (MAGFOR, 2000).

A pesar de la importancia para el país las áreas de producción de quequisque en el período 2001-2004 disminuyeron drásticamente de 30,000 ha (MAGFOR, 2003) a 6,450 ha (CEI, 2005). La reducción fue causada principalmente por enfermedades y la inestabilidad de los precios (MAGFOR, 2003). Las enfermedades más importantes del quequisque son *Dasheen mosaic virus* (DsMV) y mal seco causada por *Pythium myriotylum* (Perneel, 2006; Adiobo, 2006). DsMV ha sido reportado por Reyes *et al.* (2005) estar presente en 68-100% de las plantas en diferentes áreas del país. La reducción en la producción causada por el virus, fue estimada en 26% (Reyes *et al.*, 2005). Actualmente mal seco es considerada la enfermedad más devastadora para la producción de quequisque (Tambong *et al.*, 1998) con reducción en la producción de hasta 90% (Nzietchueng, 1983). El DsMV y mal seco son diseminados básicamente a través del material de propagación (Simone y Zettler, 1991; Nzietchueng, 1984).

La falta de semilla libre de enfermedades es un problema serio que afecta a la producción. La buena calidad de la semilla es la base para el éxito en la producción comercial de quequisque, ya que permite obtener plantas sanas, vigorosas, libres de enfermedades y con buenos rendimientos (INTA, 2000). Las técnicas de cultivo de tejido vegetales han abierto muchas

posibilidades para la producción sostenible y mejora del cultivo (Tsala *et al.*, 1996; Zok *et al.*, 1998). Según Zok *et al.* (1998) los cormelos de quequisque derivados de plantas obtenidas del cultivo de meristemas *in vitro* crecen rápido y tuberizan más temprano en comparación con las plantas propagadas convencionalmente. Una ventaja adicional de las plantas *in vitro* es el rejuvenecimiento frecuentemente experimentado en plantas que pasan por la fase de cultivo de tejidos (Pierick, 1990).

Se han hecho intentos en estrategias de mejora convencional para extender la base genética del quequisque, sin embargo debido a que el cultivo raramente florece y son muy pocas las semillas viables producidas después de la fecundación (Giacometti y León, 1994). Este método hasta ahora ha tenido poco éxito (Reyes y Nyman, 2006; Adiobo, 2006; Perneel, 2006).

En Nicaragua son pocos los cultivares que se explotan comercialmente y ninguno resistente a las enfermedades mencionadas. Para garantizar el aumento sostenido de los rendimientos y la rentabilidad del cultivo se requieren genotipos resistentes a los factores bióticos (plagas y enfermedades) y abióticos (factores climáticos, edáficos, etc.) perjudiciales generados en trabajos de mejora genética.

El cultivo de tejidos brinda la posibilidad de generar nuevos cultivares a través de la variación somaclonal que es la variación entre los tejidos o plantas derivadas de células somáticas cultivadas *in vitro*, entre ellos callos y cultivos en suspensión. El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenidas a partir de un determinado tejido (explante). Según Pérez (1998) en las células se presenta una proliferación continua, acelerada, y de apariencia desorganizada dando origen a una masa amorfa de tejidos. El término variación somaclonal fue adoptado por Larkin y Scowcroft (1981) para describir la variación mostrada en plantas regeneradas a partir de cultivo de células o de tejidos, las que presentan cambios estables a través de sucesivas generaciones, indicando que se ha originado producto de una alteración del ADN y por tanto constituye una mutación. La variación somaclonal puede ser genética o puede ser el resultado de cambios epigenéticos inducidos por el cultivo (Larkin y Scowcroft, 1981). Se había considerado que las técnicas de cultivo de tejido generaban copias exactas de la planta madre (Denton, 1997), sin embargo la variación ha sido identificada en un gran

número de especies de plantas cuando no se realiza un adecuado manejo del material *in vitro* y ocurre en plantas que se propagan por vía sexual, asexual y a todos los niveles de ploidia (Al Zahim, 1996). Existen discrepancias acerca si la variación somaclonal es resultado de diferencias preexistente en las células somáticas o si es inducida por componentes específicos del medio. Factores como el genotipo de la planta, origen del explante, composición del medio de cultivo y la edad del cultivo *in vitro* afectan la variación somaclonal (Karp, 1995).

La inducción de callos de quequisque en Nicaragua ha sido reportada por Murillo y Suárez (2001), López (2002), Páiz (2006) y Zeledón (2006). Ninguno de estos estudios reporta variación somaclonal en plantas *in vitro*, en sombreadero o en campo. El primer reporte de cambios morfológicos en las plantas de quequisque derivadas de cultivo de callos es la investigación realizada en Puerto Rico por Gupta en 1985.

Con el presente estudio se pretende lograr los siguientes objetivos

#### **Objetivo general**

- Evaluar el proceso de inducción, multiplicación de callos, regeneración de plantas y variación somaclonal en plantas aclimatadas de los cultivares de quequisque Blanco, Casitas, San Ramón, La Escalera y Ticuantepe.

#### **Objetivos específicos**

- Determinar el medio de cultivo apropiado para la multiplicación de callos.
- Regenerar plantas a partir de callos inducidos y callos multiplicados.
- Identificar en la fase de aclimatización las variaciones somaclonales en plantas regeneradas a partir de callos.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km 12½ carretera norte, Managua, y tuvo una duración de 11 meses (noviembre 2006-octubre 2007).

### 2.1. Material vegetal

Los cultivares utilizados en el estudio pertenecen al banco de germoplasma del género *Xanthosoma* conservados en el laboratorio de cultivo de tejidos. Los mismos fueron colectados en diferentes localidades del país (Cuadro 1). Los cultivares han sido nombrados con los nombres de los lugares específicos donde fueron colectados

**Cuadro 1.** Cultivares de quequisque utilizados en el estudio.

Cultivares	Procedencia	Color de cormelo	Especie
Blanco (Bco)	Nueva Guinea	Blanco	<i>X. sagittifolium</i>
Casitas (CS)	Chinandega	Rosado lila	<i>X. violaceum</i>
San Ramón (SR)	San Ramón-Matagalpa	Rosado lila	<i>X. violaceum</i>
La Escalera (LE)	San Ramón Matagalpa	Rosado lila	<i>X. violaceum</i>
Ticuan-tepe (TC)	Managua	Rosado lila	<i>X. violaceum</i>

Cormos y cormelos de los cultivares fueron extraídos de campos de producción comercial, patios y parcelas de los lugares mencionados en la Cuadro 1 y multiplicados utilizando la técnica de reproducción acelerada de semillas (TRAS) reportada por Reyes y Aguilar (2005). Se seleccionaron 40 plantas por cultivar de 30-40 días de edad a las que se les extrajeron los meristemas para ser utilizados como explantes en el ensayo.

### 2.2. Medidas de asepsia

Los utensilios como pinzas, platos petri y escalpelos fueron esterilizados en un horno a temperatura de 180°C por una hora. El cuarto de siembra y la cámara de flujo laminar se desinfectaron con alcohol antes de su uso, y luego utilizando luz ultravioleta durante 15 minutos, posteriormente se inició la siembra *in vitro*. Previo a la siembra los medios de cultivo fueron esterilizados en el autoclave a 121°C y a 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. El

medio de cultivo esterilizado fue distribuido en los platos petri plásticos esterilizados, en condiciones de cámara de flujo laminar.

### **2.3. Inducción de callos**

Las yemas apicales fueron reducidos a un tamaño de 2 cm, lavados con detergente y enjuagados con agua por 10 minutos, se transfirieron luego a la cámara de flujo laminar donde se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% durante 5 minutos y enjuagados con abundante agua estéril. Los explantes con ayuda de un estereoscopio se diseccionaron para extraer el meristemo a un tamaño aproximado de 0.2 mm.

Se establecieron 27-40 meristemos por cultivar en el medio MS + 3 mg l<sup>-1</sup> de 2,4-D reportado por Reyes y Nyman (2006). Como control se establecieron 10 meristemos por cultivar en el medio MS sin reguladores de crecimiento. Los meristemos se mantuvieron en el cuarto de crecimiento a 12 horas luz natural-oscuridad y 28±2°C de temperatura por 90 días.

#### **2.3.1. Regeneración de plantas a partir de callos inducidos**

La mitad de los callos fueron divididos y establecidos en medios de cultivo para iniciar el proceso de regeneración de plantas que incluyeron tres subcultivos. El primer subcultivo duró 80 días y se utilizó el MS sin reguladores de crecimiento. En el segundo subcultivo se utilizó el mismo medio de cultivo y duró 50 días. En el tercer subcultivo se empleó el MS + 2 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIA (López, 2002) y duró 50 días. Las plantas formadas y con raíces fueron trasladadas al sombreadero

### **2.4. Multiplicación de callos**

Los callos restantes se transfirieron a cuatro variantes de medios de cultivo para su multiplicación (Cuadro 2). Callos de 0.6-0.9 mm se dividieron en explantes de 0.2 mm, los que fueron colocados en cuatro platos petri (16 explantes por cultivar y por variante de medio de cultivo) y mantenidos por 65 días. La preparación del extracto de quequisque se realizó según metodología de Yam *et al.* (1990) (Anexo 1).

**Cuadro 2.** Medios de cultivo empleados en la multiplicación de callos.

Medios de cultivo	Citocinina (mg l <sup>-1</sup> )	Auxina (mg l <sup>-1</sup> )	Agua de coco (%)	Tiamina (mg l <sup>-1</sup> )	Extracto de quequisque (ml l <sup>-1</sup> )
Testigo	-	-	-	-	-
II*	-	3.0 (2,4-D)	-	-	-
III	-	3.0 (2,4-D)	10	0.4	20.0
IV**	0.2 (kinetina)	5.5 (ANA)	-	-	-
V***	0.4 (kinetina)	-	5	-	-

\*Reyes y Nyman, 2006; \*\*Sabapathy y Nair, 1995; \*\*\*Dottin, 2000.

#### 2.4.1. Regeneración de plantas a partir de callos multiplicados

Los callos provenientes de los medios II, III, IV y V fueron divididos y trasladados a un medio MS sin reguladores de crecimiento para la regeneración en plantas, nombrándose de acuerdo al medio de multiplicación de donde provenían. A los 65 días fueron subcultivadas a un medio MS + 2 mg l<sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIA. Las plantas desarrolladas y con raíces fueron aclimatizadas en el sombreadero donde permanecieron alrededor de 60 días.

#### 2.5. Aclimatización de plantas

Las plantas regeneradas a partir de callos inducidos y callos multiplicados al igual que las provenientes en el medio de control MS sin reguladores de crecimiento fueron aclimatadas al sombreadero con tela antiáfidos en bolsas de polietileno conteniendo humus como sustrato. Se aplicó riego por microaspersión por 10 minutos en la mañana y en la tarde durante 60 días. La relación entre las fases, medios de cultivo utilizados y la duración de las fases incluidas en el estudio se presenta en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Fases, medios de cultivo y duración.

<b>Fase de cultivo</b>	<b>Medios de cultivo</b>	<b>Duración (días)</b>
Inducción de callos	MS + 3 mg l <sup>-1</sup> de 2,4-D	90
Regeneración de plantas a partir de callos inducidos	MS sin reguladores (Medio I)	80
II subcultivo	MS sin reguladores	50
III subcultivo	MS + 2 mg l <sup>-1</sup> de 6-BAP y 0.5 mg l <sup>-1</sup> de AIA	50
Multiplicación de callos	Medio II	65
	Medio III	“
	Medio IV	“
	Medio V	“
Regeneración de plantas a partir de callos multiplicados	MS sin reguladores	65
II subcultivo	MS + 2 mg l <sup>-1</sup> de 6-BAP + 0.5 mg l <sup>-1</sup> de AIA	50
Aclimatización de plantas	Humus (sustrato)	60

## 2.6. Variables evaluadas

### 2.6.1. Inducción de callos

Tiempo de inducción, consistencia del callo (friable y acuoso), tamaño de los callos (cm). La toma de datos se realizó a los 90 días.

### 2.6.2. Multiplicación de callos

Se realizaron 3 evaluaciones a los 15, 45 y 65 días sobre el porcentaje de sobrevivencia, consistencia del callo, color, tamaño, número de explantes obtenidos de los callos y existencia de plantas por medio de cultivo y por cultivar (Cuadro 4.)

**Cuadro 4.** Variables de multiplicación de callos.

<b>Color</b>	<b>Tamaño</b>	<b>Consistencia</b>
Verde	Pequeño (0.1- 0.5cm)	Friable
Amarillo	Mediano (0.5-1 cm)	Acuoso
Café	Grande (1-2.5cm)	
Necrótico		

Según Gómez (1998) los callos friables son aquellos que poseen apariencia seca, compactos y de colocación amarillo blanquecina. Los callos acuosos, por el contrario, son de consistencia

blanda y suave, color crema oscuro que no se pueden multiplicar y no regeneran plantas (Figura 2 y Anexos).

Para encontrar las diferencias entre los medios de cultivo de multiplicación de callos por cultivares se utilizó un análisis de varianza con un diseño DCA con separación de media Waller y Duncan. Para encontrar las diferencias estadísticas entre los tamaños de los callos para cada medio de cultivo se realizó la prueba no paramétrica para dos o más muestras independientes de Kruskal y Wallis (Anexo 2).

### 2.6.3. Regeneración de plantas a partir de callos inducidos y callos multiplicados

En la regeneración de plantas a partir de inducción se hicieron 3 evaluaciones a los 15, 45 y 80 días para el muestreo se utilizaron 20 explantes. En el II subcultivo se hicieron 2 evaluaciones a los 10 y 30 días. Las plantas regeneradas a partir de multiplicación de callos se evaluaron a los 30 y 50 días. En el III subcultivo no se hicieron evaluaciones. Las variables que se evaluaron se describen en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Descripción de las variables evaluadas en la regeneración de plantas.

<b>Variables evaluadas</b>	<b>Descripción</b>
Callo	Callo en crecimiento
Callo + raíz	Callo con raíz formada
Multiyema	Multiyema
	Multiyema + raíz
Planta	Plantas en crecimiento
	Planta + raíz
	Multiyema + planta en crecimiento
	Multiyema + planta + raíz

Las multiyemas son estructuras globulares desarrolladas en callos como forma intermedia a la formación de plantas (López, 2002), generalmente de color crema oscuro (Figura 4 y Anexos).

### 2.6.4 Aclimatización de plantas

Se evaluaron a través de conteos visuales el número plantas aclimatadas obtenidas por cada cultivar y medio de cultivo de multiplicación, el número y tipo de variaciones en las hojas y se evaluó el porcentaje de plantas atípicas.

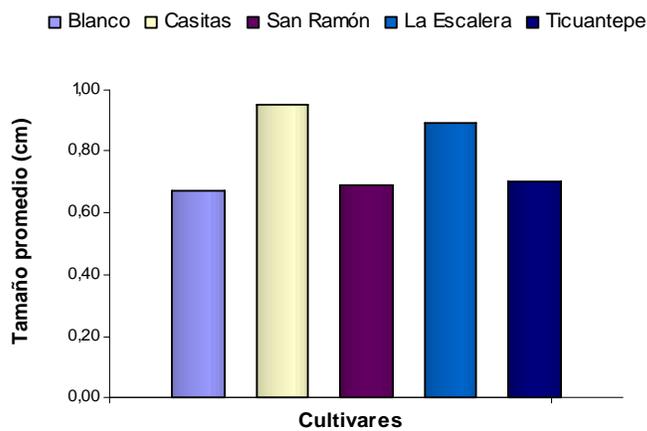
#### **2.6.4.1 Variables morfológicas**

A los 60 días de establecidas las plantas en la fase de aclimatización se evaluaron las variables altura de planta (cm), número de hojas, diámetro del tallo (cm), ancho de hoja (cm), largo de hoja (cm) y distancia entre lóbulo (cm).

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Inducción de callos

A los 90 días después de iniciado el proceso de inducción de callos 100% de los explantes en todos los cultivares presentaban callos friables, de apariencia seca, compactos y de coloración amarillo blanquecino. Sin embargo, hubo diferencias en el tamaño de los callos entre los cultivares. Los cultivares CS y LE registraron callos con longitud promedio de 0.95 y 0.9 cm respectivamente, SR y TC 0.7 y Bco 0.67 cm (Figura 1).



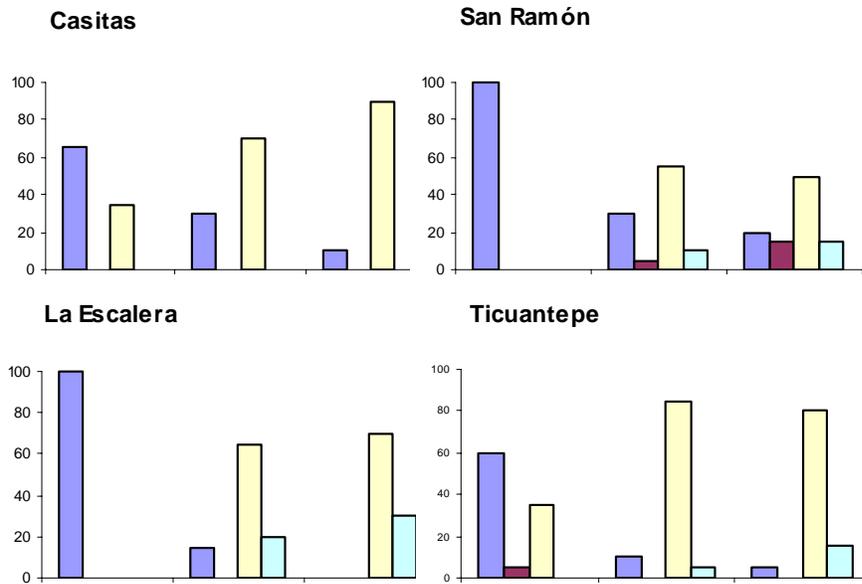
**Figura 1.** Tamaño promedio de callos (cm) de los cultivares de quequisque (*Xanthosoma* spp.) Bco, CS, SR, LE, TC en el medio de cultivo MS+ 3 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D a los 90 días.



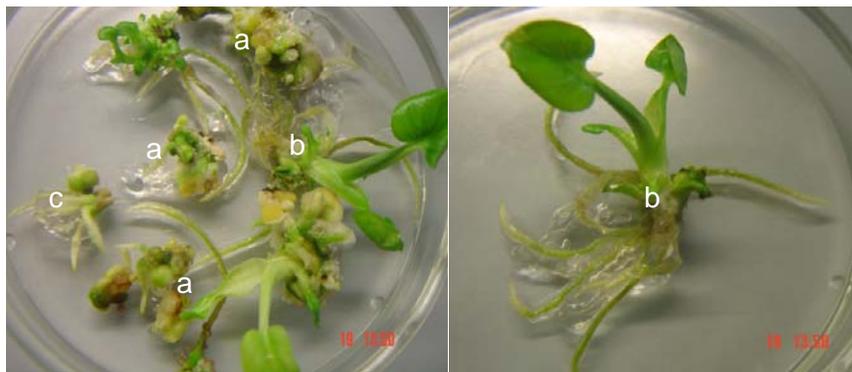
**Figura 2.** Callos friables cultivar CS a los 80 días

#### 3.2. Regeneración de plantas a partir de callos inducidos

A los 15 días de iniciada la fase de regeneración de plantas se registraron 60-100% de callos en todos los cultivares, posteriormente disminuyó a los 45 y 80 día. A los 45 días se observaron 55-85% de multiyemas en todos los cultivares con excepción de Bco (10%). También se registraron las primeras plantas regeneradas 5-20% exceptuando CS. A los 80 días la regeneración de plantas aumentó 15-30% en todos los cultivares con excepción de CS que aún no registraba plantas (Figura 3).



**Figura 3.** Estructuras desarrolladas de los callos inducidos en la fase de regeneración de plantas en el medio MS sin reguladores de crecimiento a los 15, 45 y 80 días en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC.



**Figura 4.** Estructuras de crecimiento desarrolladas: a) multiyemas, b) planta con raíces y c) callo con raíz.

En el subcultivo II a los 10 días los cultivares registraron multiyemas como estructura predominante, con excepción de SR que presentó 75% de callos sin crecimiento. También se

registraron callos en rangos de 10-25%. A los 30 días el porcentaje de multiyemas aumentó en CS, SR y TC; y disminuyó en Bco. El porcentaje de callos disminuyó con excepción de Bco que mantuvo 10%. LE y TC no registraron callos. El porcentaje plantas regeneradas aumentó en todos los cultivares, con excepción de TC (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Estructuras desarrolladas de los callos inducidos en la fase de regeneración de plantas (segundo subcultivo) en el medio MS sin reguladores de crecimiento a los 10 y 30 días en Bco, CS, SR, LE y TC.

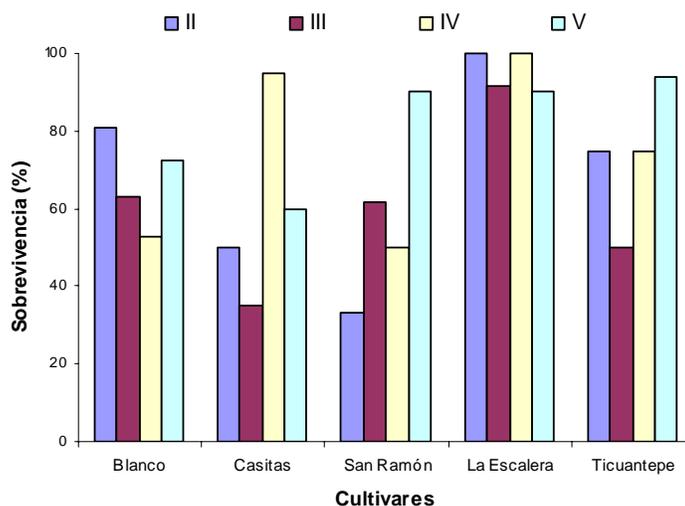
Cultivares	10 días					30 días				
	C	C+R	My	P	SC	C	C+R	My	P	SC
Blanco	10	5	80	5	-	10	10	45	35	-
Casitas	20	-	80	-	-	5	-	85	10	-
San Ramón	25	-	-	-	75	20	5	40	35	-
La Escalera	25	-	70	5	-	-	-	70	30	-
Ticuantepe	25	5	50	20	-	-	10	70	20	-

C = callo, C+R = callo con raíz, My = multiyemas, P = planta, SC = sin crecimiento

### 3.3. Multiplicación de callos

#### 3.3.1. Supervivencia

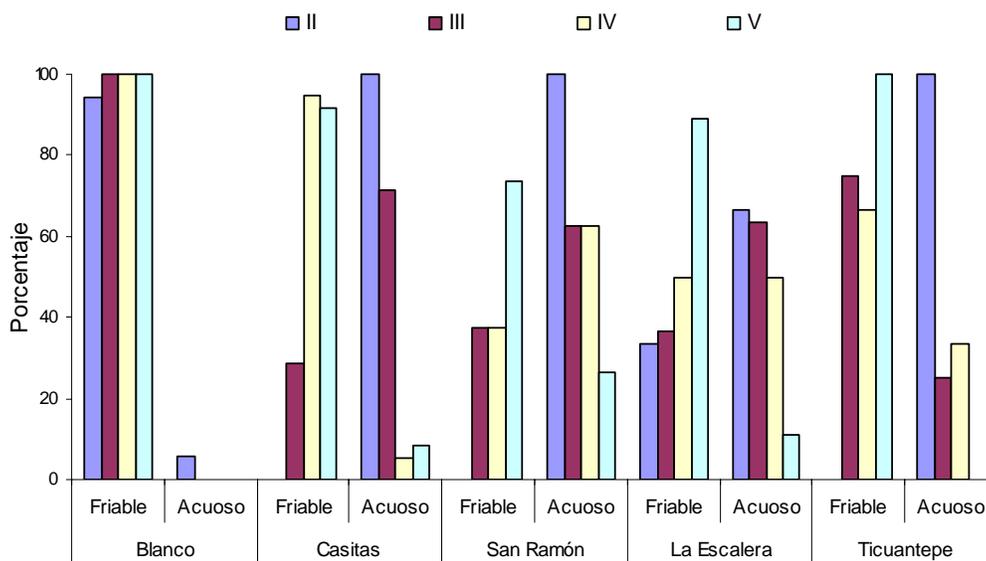
El medio de cultivo II registró 75-100% de supervivencia en los cultivares Bco, LE y TC y 33-50% en SR y CS respectivamente. En el medio de cultivo III se obtuvo 92% de supervivencia en LE y 35- 63% en los cultivares restantes. Los medios de cultivo IV y V registraron 50-100% de supervivencia en todos los cultivares (Figura 5).



**Figura 5.** Porcentaje de supervivencia de callos multiplicados en los medios de cultivo II, III, IV y V en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC a los 65 días.

### 3.3.2. Consistencia de los callos

Callos friables y acuosos se obtuvieron en todos los cultivares en diferentes porcentajes. En el medio de cultivo V se produjeron 75-100% de callos friables y superó el porcentaje de callos friables obtenidos en otros medios (Figura 6). En el medio de cultivo IV se obtuvieron 37.5-100% de callos friables, y en medio de cultivo III 25-100%. El medio de cultivo II produjo 100% de callos acuosos en tres cultivares. El medio de cultivo III produjo más de 60% de callos acuosos en tres cultivares. El medio de cultivo III produjo más de 60% de callos acuosos en tres cultivares. Entre los cultivares, Bco produjo 5% de callos acuosos en el medio de cultivo II únicamente.



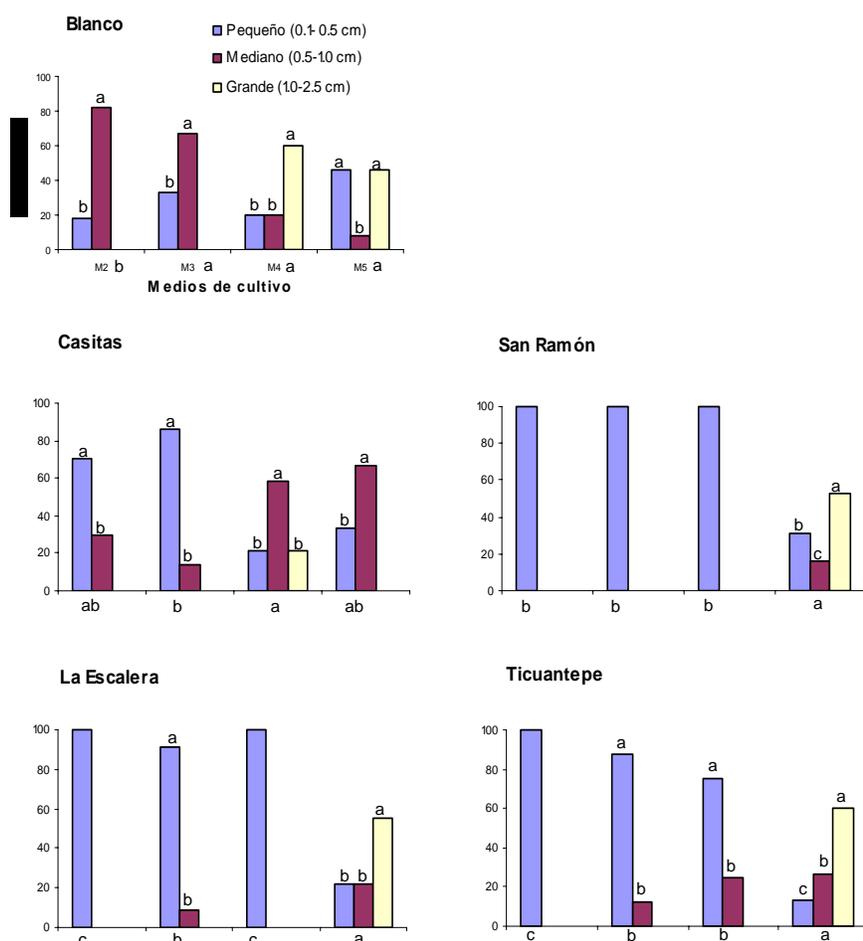
**Figura 6.** Porcentaje de callos friables y acuosos obtenidos en los cultivares de quequisque (*Xanthosoma* spp.) Bco, CS, SR, LE y TC en los medios de cultivo II, III, IV y V a los 65 días.

### 3.3.3. Tamaño de los callos

El análisis estadístico realizado por cultivar indica que hubo diferencias significativas entre medios de cultivo y entre los tamaños de callos. En Bco los medios de cultivo III, IV y V fueron estadísticamente similares y diferentes al medio de cultivo II. Los medio de cultivo II y III no produjeron callos grandes y la producción de callos medianos fue significativamente superior que la producción de callos pequeños. Los medios de cultivo IV y V la producción de callos grandes fue significativamente superior, el medio de cultivo V junto con la producción de callos pequeños. En CS los medios de cultivo II, IV y V fueron estadísticamente similares, los medios de cultivo II y V fueron a su vez estadísticamente similares al medio de cultivo III.

El medio de cultivo IV fue estadísticamente superior al medio de cultivo III. En San Ramón el medio de cultivo V resultó superior a los demás medios de cultivo y fue el único que desarrolló callos medianos y grandes. En este medio la producción de callos grandes fue estadísticamente superior. En La Escalera y Ticuantepe el medio de cultivo V fue superior y en donde la producción de callos grandes fue significativamente superior.

El medio de cultivo V indujo callos grandes en 4 cultivares en rango de 40-60%. En el medio de cultivo IV se indujeron 21 y 60% de callos grandes en Bco y CS respectivamente. El medio de cultivo II indujo 100% de callos pequeños en tres cultivares. El medio de cultivo III indujo al menos 80% de callos pequeños en cuatro cultivares. Los cultivares SR, LE y TC registraron el mayor porcentaje de callos pequeños en los medios de cultivo II, III y IV. El cultivar Bco registró el mayor porcentaje de callos grandes y medianos (Figura 7).



**Figura 7.** Tamaño promedio (cm) de callos de los cultivares de quequisque (*Xanthosoma* spp.) Bco, CS, SR, LE y TC en cuatro medios de cultivo II, III, IV y V a los 65 días.

### 3.3.4. Estructuras desarrolladas

En la fase de multiplicación de callos, además de callos los cultivares produjeron multiyemas, puntos de crecimiento y plantas. El medio de cultivo V indujo la formación de plantas en tres cultivares y puntos de crecimiento en 4 cultivares. El medio de cultivo IV indujo puntos de crecimiento en dos cultivares y el medio de cultivo III en uno (Cuadro 7). Las multiyemas fueron las estructuras predominantes producidas por los medios de cultivo en la mayoría de los cultivares. SR, LE y TC desarrollaron puntos de crecimiento y plantas, Bco produjo puntos de crecimiento en tres medios de cultivo y CS sólo produjo multiyemas.

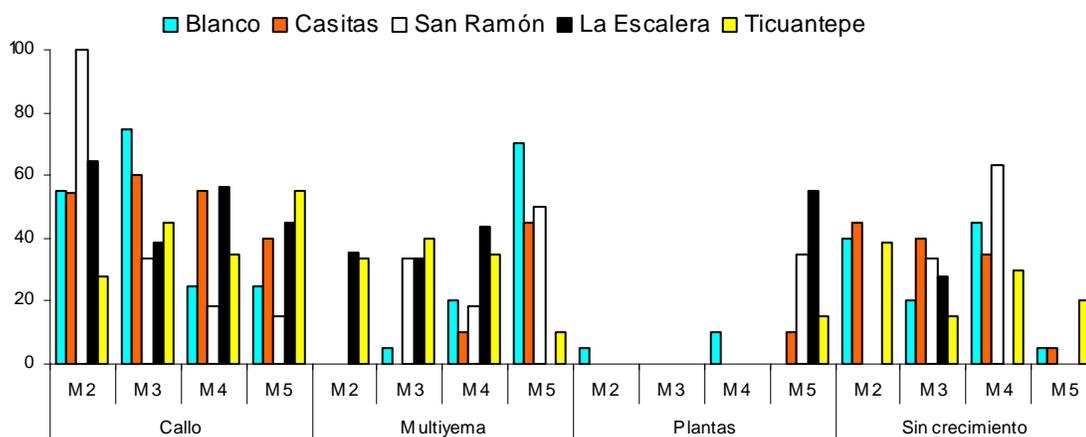
**Cuadro 7.** Estructuras de desarrollo de los callos a los 65 días en la etapa de multiplicación en los medios de cultivo II, III, IV y V en los cultivares Bco, CS, SR, LE, TC.

Cultivares	Medios de cultivo	Callos totales	Estructuras (%)		
			Multiyemas	Puntos de crecimiento	Planta formada
Blanco	II	17	5.9	-	-
	III	12	16.7	25	-
	IV	10	60	20	-
	V	13	38.5	30.8	-
Casitas	II	10	20	-	-
	III	7	-	-	-
	IV	19	15.8	-	-
	V	12	41.7	-	-
San Ramón	II	4	-	-	-
	III	8	25	-	-
	IV	8	12.5	-	-
	V	19	42.1	21.1	10.5
La Escalera	II	12	-	-	-
	III	11	-	-	-
	IV	12	33.3	-	-
	V	18	83.3	27.7	44.4
Ticuantepe	II	12	18.3	-	-
	III	8	-	-	-
	IV	12	-	8.33	-
	V	15	40	40	6.6

### 3.4. Regeneración de plantas a partir de callos multiplicados

A los 50 días de iniciada la fase de regeneración de plantas a partir de callos multiplicados se registraron callos en crecimiento, callos sin crecimiento, multiyemas y plantas en diferentes proporciones. Callos en crecimiento predominaron como estructura desarrollada. Los cinco cultivares registraron callos en todos los medios de cultivo. Los medios de cultivo II y III indujeron los mayores porcentajes de callos. Callos sin crecimiento fueron la segunda estructura más observada. El medio de cultivo III registró callos sin crecimiento en todos los

cultivares, y el medio de cultivo IV lo hizo en tres cultivares. El medio de cultivo V indujo los valores más bajos de callos sin crecimiento. Las multiyemas fueron las siguientes estructuras más registradas. El medio de cultivo V indujo el mayor porcentaje de multiyemas, seguido de los medios de cultivo IV y III (Figura 8). Se regeneraron plantas solamente en el medio de cultivo V en todos los cultivares con excepción de Bco. Los medios de cultivo II y IV indujeron plantas en pequeños porcentajes en Bco.



**Figura 8.** Callos en crecimiento, multiyemas, plantas y callos sin crecimiento registradas a los 50 días en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC que fueron multiplicados en los medios de cultivo II, III, IV y V establecidos en el medio MS sin reguladores de crecimiento.

### 3.5. Aclimatización de plantas y variación somaclonal en sombreadero

Se aclimataron en el sombreadero 2197 plantas totales, 896 plantas provenientes de callos inducidos y 1301 plantas de callos multiplicados. 858 plantas provenían del medio de cultivo V de multiplicación de callos, 433 del IV y 10 del II. El cultivar LE regeneró 839 plantas, 586 Bco, 300 TC, 272 CS y 200 SR (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Número de plantas aclimatadas por medio de cultivo (I, II, III, IV y V) de los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC.

Cultivar	Meristemos iniciales	Plantas por medio de cultivo					Plantas totales
		I*	II**	III**	IV**	V**	
Bco	40	220	10	-	318	38	586
CS	33	180	-	-	78	14	272
SR	30	104	-	-	-	96	200
LE	28	261	-	-	37	541	839
TC	27	131	-	-	-	169	300
<b>Plantas totales</b>		<b>896</b>	<b>10</b>	<b>-</b>	<b>433</b>	<b>858</b>	<b>2197</b>

\*Plantas de callos inducidos \*\* Plantas de callos multiplicadas.



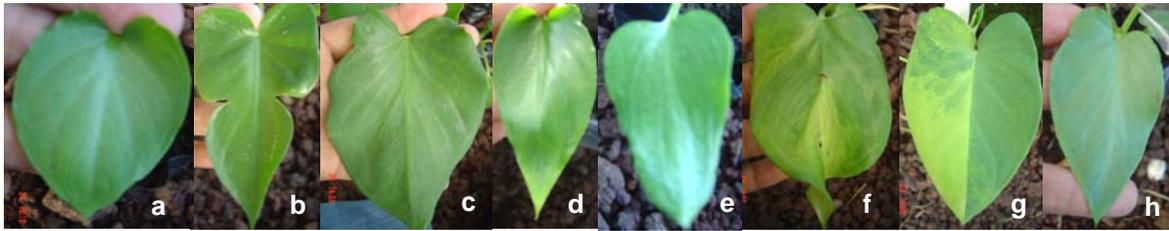
**Figura 9.** Plantas de los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC provenientes de callos inducidos y callos multiplicados en etapa de aclimatización.

El cuadro 9 presenta el porcentaje de plantas de los cuatro cultivares que exhibieron algún tipo de variación somaclonal. Las variaciones observadas fueron hoja redondeada, en forma de basto, con borde rugoso, alargada, sin lóbulos, decoloración, punta enrollada, deformación en el lóbulo y pecíolo alargado. Plantas de SR-I presentaron hojas con borde rugoso, LE-V pecíolo alargado, TC-I hojas alargadas, LE-I decoloración de la hoja, TC-V hoja con punta enrollada fueron variaciones únicas no observadas en otros cultivares.

El mayor porcentaje de variación lo obtuvo SR-I (17.4%), seguido de LE-IV (13.9%), TC-I (10.9%) y el menor porcentaje 5.5% TC-V. En el cultivar Bco no se observó ningún tipo de variación. LE-V presentó variaciones de hoja redondeada, hoja en forma de bastos, hojas sin lóbulos y pecíolos alargados.

**Cuadro 9.** Variaciones somaclonales (%) observadas a los 60 días después del establecimiento de los cultivares en el sombreadero.

Variación morfológica	Cultivares por medio de cultivo (%)								
	CS-I	CS-IV	SR-I	SR-V	LE-I	LE-IV	LE-V	TC-I	TC-V
Hoja redondeada	3.9	-	12.3	7.4	3.0	8.3	1.5	1.4	-
Hoja en forma de basto	-	1.6	1.7	-	1.2	5.6	2.2	-	4.1
Hoja con borde rugosos	-	-	1.7	-	-	-	-	-	-
Hoja alargada	-	-	-	-	-	-	-	5.4	-
Hoja sin lóbulo	3.2	4.7	-	-	-	-	1.2	4.1	-
Decoloración de la hoja	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-
Punta enrollada	-	-	-	-	-	-	-	-	1.4
Deformación en el lóbulo	-	-	1.7	-	1.2	-	-	-	-
Pecíolo alargado	-	-	-	-	-	-	2.2	-	-
<b>Total</b>	<b>7.1</b>	<b>6.3</b>	<b>17.4</b>	<b>7.4</b>	<b>6</b>	<b>13.9</b>	<b>7.1</b>	<b>10.9</b>	<b>5.5</b>



**Figura 10.** Variaciones en forma de las hojas a) hoja redonda; b) hoja en forma de basto; c) hoja con borde redondeado; d) hoja alargada; e) hoja sin lóbulo; f) hoja con punta enrollada; g) decoloración en la hoja; h) deformación en el lóbulo.

En el cuadro 10 se muestran los promedios obtenidos de las variables morfológicas evaluadas en las plantas aclimatadas mostrando diferencias entre los cultivares siendo Bco V con mayor altura de planta (18.9 cm), LE V con mayor número de hojas (5), Bco V mayor diámetro de tallo (1.1 cm), Bco IV mayor ancho y largo de hoja y distancia entre lóbulo.

**Cuadro 10.** Promedios de variables morfológicas en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC a los 60 días después del establecimiento en sombreadero

Cultivares	Altura de planta (cm)	Numero de hojas	Diámetro del tallo (cm)	Ancho de hoja (cm)	Largo de hoja (cm)	Distancia entre lóbulos (cm)
Bco I	10.5	3	0.8	6.2	7.86	2.88
Bco IV	18.9	2	0.64	8.7	10.8	5.8
Bco V	14.4	3.6	1.1	7.62	9.46	3.2
CS I	13.4	4.6	0.74	7.5	10.8	3.4
CS IV	11	3.8	0.42	5.1	8.2	1.9
CS V	13.4	3.4	0.54	7.2	10.3	3.8
SR I	16.6	3.2	0.46	5.5	8.4	2.5
SR V	14.7	4.2	0.56	8	8.5	3.4
LE I	14	3.8	0.9	7.64	9.7	2.96
LE IV	12.7	4	0.8	6.44	8.14	2.5
LE V	11.7	5	1	7.42	9.76	2.7
TC I	14.3	4	0.98	6.3	9.1	2.7
TC V	6.7	3.2	0.6	5.2	6.5	1.5

Según Hartmann y Kester (1983) el proceso de producción de callos sigue un patrón logarítmico de crecimiento: (a) un periodo inicial de lenta división celular, en el cual se requiere la adición de auxinas, (b) una fase de rápida división celular que involucra la síntesis de ADN, ARN y proteínas, (c) reducción gradual de la división celular, y (d) diferenciación de células del parénquima y de tipo vascular.

La utilización de  $3 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D como inductor de callos fue efectiva en todos los cultivares. 100% de callos inducidos fueron de consistencia friable, este medio de cultivo utilizado también por Reyes y Nyman (2006) donde obtuvieron 26-96% de callos coincide con lo

reportado por Gómez (1998) en relación al uso del 2,4-D puesto que incrementa el crecimiento desordenado de las células lo que lleva a la formación de callos además de intervenir en la friabilidad de estos.

Una vez que los callos morfogénéticos han sido aislados la propagación puede darse por la subdivisión del callo o por medio de la preparación de suspensiones celulares. Esto puede ocurrir en el mismo medio de cultivo o puede necesitar ser transferido a otro medio (George y Sherrington, 1984). En el presente estudio se utilizaron cuatro variantes de medio de cultivo para la multiplicación de callos. El medio de cultivo II (MS+ 3 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D) registró el mayor porcentaje de callos acuosos en todos los cultivares seguido del medio III (MS + 3 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D + 10% AC + 0.4 mg l<sup>-1</sup> tiamina + 20 ml l<sup>-1</sup> EQ) ambos contenían 2,4-D en el medio de cultivo y se cree que esta fue la causa de su consistencia. Por el contrario los medios de cultivo IV (MS + 0.2 mg l<sup>-1</sup> kinetina + 5.5 mg l<sup>-1</sup> ANA) y V (0.4 mg l<sup>-1</sup> kinetina + 5% agua de coco) indujeron mayor porcentaje de callos friables, ambos contenían kinetina. Según Parra (2002) la kinetina estimula la división celular, el crecimiento y organogénesis de los callos en las células. El agua de coco (aplicada en concentraciones de 5 y 10%) tuvo mejor respuesta cuando fue combinado con kinetina en el medio V. Según Dix y Van Staden (1982) el agua de coco posee contenidos variables de auxina, giberelinas y citocininas, las cuales, solas o en combinación pueden estimular el desarrollo del callo en algunas especies. Según Khayri (1995) el agua de coco contiene difenilurea, auxina, ribósico de zeatina y vitaminas que llevan a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo de la célula vegetal.

La producción de callos acuosos fue limitada a 5% y en un sólo medio de cultivo en Bco, lo que sugiere una respuesta genotípica. El cultivar Bco pertenece a la especie *X. sagittifolium* (2n = 26); los cultivares CS, SR, LE y TC pertenecen a la especie *X. violaceum* (2n = 24). Respuestas dependientes del genotipo en la inducción y multiplicación de callos y regeneración de plantas han sido reportadas por Litz (1984), Pérez (1998) y George y Sherrington (1984).

La capacidad de crecimiento (callos grandes) fue mayor cuando éstos fueron transferidos a los medios de cultivo IV y V, lo que favoreció la posterior regeneración de plantas. Dottin (2000) indujo 90% de callos medianos y grandes utilizando el medio de cultivo V. Según Liu (1981)

el tamaño del callo no determina el potencial morfogénico de éste, pero un callo grande significa la posibilidad de un mayor fraccionamiento del mismo en el momento de subcultivarlo; lo que produce un número elevado de nuevos callos en cultivo y aumenta la probabilidad de inducir variabilidad genética.

El proceso de regeneración de plantas a partir de callos inducidos tuvo una duración de 180 días y el de callos multiplicados 115 días. Este proceso requiere la deshabitación de los callos al medio de inducción y la habituación al nuevo medio para la regeneración de plantas. El cambio del medio de inducción (MS + 2,4-D mg l<sup>-1</sup>) por el medio de regeneración (MS sin reguladores de crecimiento) indujo la formación de plantas en cuatro cultivares. La eliminación de la auxina exógena tiene como consecuencia el desarrollo del embrión y la formación de la planta. La diferenciación de los embriones y plántulas tiene lugar al transferir los callos a un medio sin reguladores de crecimiento (Kohlenbach, 1985; Hartman, 1974; Abo El Nil y Zettler, 1976; Strauss y Arditti, 1980; Gupta, 1985).

El cultivar CS a los 80 días aún no había regenerado plantas pero su proceso de regeneración inició a los 30 días del II subcultivo lo que sugiere la posibilidad de ser un cultivar recalcitrante. El índice de propagación es diferente en cada una de las especies y para las distintas variedades o clones dentro de la especie (Vuylsteke y De Lanhege, 1985) en muchos casos la diferencia entre genotipos puede ser determinante, existiendo algunos cultivos cuya multiplicación es extremadamente difícil, conocidas como genotipos recalcitrantes (Dottin, 2000).

El proceso de regeneración de plantas a partir de callos tiene como estructura intermedia la formación de multiyemas, llamadas protocormos por George (1993), estructuras globulares por Gómez *et al.* (1992) capaces de regenerar plantas. En Nicaragua la producción de multiyemas en el cultivo de callos de quequisque fue reportada por López (2002). En el estudio se observaron formación de multiyemas antes de la formación de plantas en el medio de regeneración de callos inducidos y callos multiplicados siendo indicador de la formación de plántulas.

El porcentaje de regeneración de plantas a partir de callos multiplicados en el medio de cultivo V fue mayor de plantas en CS, TC, SR y LE. Bco regeneró plantas en el medio II y IV. No se regeneraron plantas en los medios de cultivo II y III posiblemente por la presencia de 2,4-D en los medios. Según George y Sherrington (1984) niveles altos de auxina, a menudo usados para promover la dispersión de células, pueden resultar en pérdida completa de la capacidad morfogénica. Mantener auxinas altas en el cultivo usualmente causa que el desarrollo de los embriones se disminuya o se pierda la capacidad embriogénica. Es necesario para los tejidos o células subcultivadas que el medio contenga una reducida concentración de auxinas o la ausencia de ellas. Sin embargo en los medios de cultivo IV y V se obtuvo una buena respuesta en la regeneración atribuyendo su éxito a la adición de kinetina al medio de multiplicación. Según George y Sherrington (1984) la incorporación de citoquininas en el medio puede a veces asistir la morfogénesis o el crecimiento de los brotes adventicios y embriones somáticos. Las citoquininas pueden promover el crecimiento de embriones preformados posibilitando el crecimiento de plántulas.

La respuesta diferenciada de Bco en el medio IV puede explicarla la condición genética del cultivar. Para Litz (1984) algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros no responden en el mismo medio. Según Vuylsteke (1998) el índice de propagación es diferente en cada una de las especies y para las distintas variedades o clones dentro de la especie.

Fue posible la aclimatización de plantas regeneradas a partir de callos inducidos y de callos multiplicados en los medios de cultivo IV y V. El proceso desde sus inicios duró 270 días y no presentó mayores complicaciones más que las dificultades de multiplicación y regeneración de plantas en los medios de multiplicación de callos II y III.

La inducción de callos en quequisque ha sido reportada por Gupta (1985), Nguyen y Nguyen (1987), Liu *et al.* (1988), Gómez *et al.*, 1992, Dottin, 2000, Ndoumou *et al.* (1995), Nyochembeng y Garton (1998), Murillo y Suárez (2001), López (2002), Páiz (2006), Zeledón (2006) y Reyes y Nyman (2006).

La ocurrencia vía-callos de embriogénesis somática en quequisque ha sido reportada por Dottin, 2000; Gómez *et al.* 1992; Murillo y Suárez, 2006; Zeledón, 2006. Gómez *et al.* (1992) mencionan que en el proceso de regeneración de plantas a través de callos ocurre el proceso de embriogénesis somática y que es difícil encontrar todas las etapas clásicas del desarrollo del embriode con existencia de polaridad en ellos. A través de estudios histológicos demostraron que en las estructuras coincidían el brote y la raíz. La existencia de embriogénesis somática abriría la posibilidad de automatizar (biorreactores, cultivos en suspensión y sistemas de inmersión temporal) la propagación *in vitro* de plantas sanas, propagar genotipos promisorios y aumentar los rendimientos y la calidad de la cosecha. En el presente estudio no se logró identificar embriones somáticos por la carencia de equipos para realizar el estudio histológico.

Muchos autores identifican variaciones somaclonales en las plantas provenientes de callos. Los cambios producidos son generalmente indeseables, pero la aparición ocasional de caracteres no encontrados en poblaciones naturales, y que representan una ventaja desde el punto de vista agronómico, permite utilizar este fenómeno en programas de mejora vegetal. Se ha utilizado en algunos casos para conferir caracteres deseables a cultivares de importancia económica, entre los que se incluyen resistencia a enfermedades, tolerancia a suelos ácidos y a salinidad siendo utilizada en programas de mejoramiento, especialmente para especies con sistemas genéticos limitados y/o de base genética estrecha que incluyen la misma variación somaclonal, la mutagénesis, el cultivo de protoplastos e ingeniería genética. En estos casos se requiere desarrollar protocolos eficientes para la regeneración de plantas con las nuevas características (Cordone *et al.*, 2000). Los resultados aquí presentados son muy importantes para futuros estudios de mejora genética en el cultivo.

Las plantas aclimatizadas presentaron variaciones morfológicas fácilmente observables. Los conteos visuales ayudan a evaluar el porcentaje de variación, sin embargo no están exentos de errores ya que las plantas pueden o no presentar variaciones sin ser observadas. Para tener una perspectiva de los cambios totales ocurridos en las plantas regeneradas a partir de callos se requieren evaluaciones posteriores del comportamiento de las plantas en el campo (rendimiento, resistencia, cambios morfológicos de las estructuras subterráneas, etc.), y estudios citológicos y moleculares.

La mayor parte de la variación obtenida proviene al parecer del cultivo de callos al inicio de la división celular, cuando se incrementa el riesgo de inestabilidad cromosómica (Cordone *et al.*, 2000).

Según Dottin (2000) la variabilidad somaclonal puede ser producida por los genotipos y el número de subcultivos a los que se sometan los callos. La variabilidad se puede inducir por los reguladores de crecimiento. El 2,4 D es el principal responsable de la variabilidad causada por la variación somaclonal, puesto que afecta el ADN, provoca deformaciones, mitosis irregular y proliferaciones de células (Leopold, 1963). Según Cardone *et al.* (2000) el 2,4-D induce la desdiferenciación, proceso generador de los cambios.

#### IV. CONCLUSIONES

- Los cultivares estudiados produjeron 100% de callos al establecer meristemos en el medio de cultivo MS + 3 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D.
- Todos los cultivares regeneraron plantas a partir de callos inducidos en rango de 100-260 plantas.
- La multiplicación de callos fue superior en los medios de cultivo IV y V. El medio de cultivo V indujo callos grandes (1.0-2.5 cm) en cuatro cultivares y el medio de cultivo IV en dos cultivares.
- Los callos multiplicados en el medio de cultivo V regeneraron plantas en todos los cultivares, los callos multiplicados en el medio de cultivo IV lo hicieron en tres cultivares. Los callos multiplicados en los medios de cultivos II y III no regeneraron plantas, a excepción de Bco que regeneró 10 plantas en el medio de cultivo II.
- Las plantas aclimatadas en el sombreadero provenían de los medios de cultivo I, IV y V. LE regeneró y aclimatizó 839 plantas en sombreadero, Bco 586, TC 300, CS 272 y SR 200.
- En el sombreadero todos los cultivares a excepción de Bco presentaron variaciones morfológicas: hojas redondeadas, en forma de basto, con borde rugoso, alargada, sin lóbulo y pecíolo alargado. SR-I presentó 17.4% de variaciones, LE-IV 13.9% y TC-I 10.9%.

## **V. RECOMENDACIONES**

- Evaluar en condiciones de campo la variación somaclonal y el comportamiento agronómico de las plantas provenientes de los diferentes tratamientos.
- Evaluar la resistencia a DsMV y mal seco de las plantas regeneradas del ensayo con miras ser utilizadas en trabajos de mejora genética del cultivo.
- Utilizar marcadores moleculares para determinar variaciones genéticas a nivel del ADN en las plantas provenientes de callos.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-EL, NIL, M. M.; ZETTLER, W.** 1976. Natural occurrence of dasheen mosaic virus in Egyptian taro (*Colocasia antiquorum*). Plant Disease Report 60: 281-285.
- ADIOBO, A.** 2006. Biological control of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) root rot disease caused by *Pythium myriotylum* Dresihl.: importance of soil organic matter content and cultural practices. PhD Thesis.
- AL ZAHIM, M.** 1996. Induction of somatic embryogenesis in the use of RAPD to classify and to detect somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.). PhD Thesis. University of Birmingham, UK. 184 pp.
- CARDONE, S., OLMOS, S., ECHENIQUE, V.** 2000. Parte III. Métodos para generar variabilidad. En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Pag. 81-96.
- CEI (CENTRO DE EXPORTACIONES E INVERSIONES DE NICARAGUA).** 2005. Servicio de Inteligencia Comercial. Nicaragua: Exportaciones Enero-Diciembre 2004.
- DENTON, I. R.** 1997. Phenotypic variation of *Solanum tuberosum* L. Potato research, 20, 131-136
- DIX, L y VAN STADEN, J.** 1982. Auxin and gibberellin like substance in coconut milk and malt extract. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1 (4): 239-242.
- DOTTIN M. P.** 2000. Propagación *in vitro* de malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Tesis de doctorado. Universidad Central de las Villas UCLV. Cuba
- GEORGE E.** 1993. Plant propagation by tissue (ed) Exegetics limited, Edington, Wilts, Inglaterra, 9-65
- GEORGE E. Y SHERRINGTON P.** 1984. Plant propagation by tissue culture. Exegetics Ltd., Edington, Westbury, Wilts. BA13 4 QG, England. Inglaterra, pp. 65-67, 351-356.
- GIACOMETTI, D. C. y LEÓN.** 1994. Tannia. Yautia (*Xanthosoma sagittifolium*). En: Neglected Crops: 1492 from a different perspective. Plant production and protection series No. 26. FAO, Rome, Italy. (Eds. L.E Hernaldo y J. León), Rome Italy, pp. 253-258
- GUPTA. P.** 1985. Plant regeneration and variability from tissue culture of cocoyam *X. sagittifolium* and *X. violaceum*. Plant cell report 4: 88-91.
- GÓMEZ KOSKY, R.** 1998. Cultivo de células y tejidos. En: Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Pérez P Editor. Santa Clara. Cuba.
- GÓMEZ L., VALVERDE R., ARIAS O. y THORPE T.** 1992. Regeneración de tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*) por embriogénesis somática. En: Agronomía Costarricense 16 (2): 219-223.
- 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.
- HARTMANN, H. T. y KESTER, D. E.** 1983. Plant propagation. Principles and practices. Prentice/ Hall Internacional, Inc. USA.
- INTA (INSTITUTO NICARAGÜENSE DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA).** 2000. El cultivo de quequisque. Guía tecnológica, Managua, Nicaragua. 24 pp.
- KARP, A.** 1995. Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*. 85: 295-302
- KHAYRI, J. M.** 1995 The role of coconut milk in plant tissue culture. En: Heman E. B. recent advances in plant tissue culture. 23-56

- KOHLNBACH, H. W.** 1985. Fundamental and applied aspects of *in vitro* plant regeneration by somatic embryogenesis. En: *In vitro* techniques propagation and long term storage. Ed. By A. Shaefer. P. 101-109.
- LARKIN, P. y W. SCOWCROFT.** 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor Appl Genet*, 60: 197-214.
- LEOPOLD, C. A.** 1963. Auxins and plant growth. Colección Ciencia y Técnica. Instituto del libro. La Habana, Cuba. 354 p.
- LIU, L.J., MARQUEZ E.R., LICHA, M., Y BIASCOECHEA, M.L.** 1988. Tanier (*Xanthosoma* spp.) propagation *in vitro*. *J. Agric. Univ.* Pág. 413-425.
- LIU, M. C.** 1981. *In vitro* methods applied to sugar cane improvement in plant tissue culture methods and application in agriculture. Ed. B y T. A. Thorpe. New York. Academic press. P. 299-323.
- LITZ, R. E.** 1984. *In vitro* somatic embriogénesis from callus of jaboticaba *Myciaria, laliflora*. *Hort science*. 19. 62-64
- LÓPEZ, R. C.** 2002. Producción de plantas libres de virus y morfogénesis indirecta a partir del cultivo de meristemos de tres genotipos de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Tesis (Ing Agr) Managua, Nicaragua. 42 pág.
- LÓPEZ, M., VÁSQUEZ, E. y LÓPEZ, E.** 1995. Raíces y tubérculos. Pueblo y Educación, Universidad Central de Las Villas, Cuba. 312 pp.
- MAGFOR (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y FORESTAL).** 2000. producción y Comercialización de la malanga. *Agricultura y desarrollo* 60, 1-7
- MAGFOR (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y FORESTAL).** 2003. Informe de producción agropecuaria de Nicaragua 2002- 2003. Dirección de Estadísticas del MAGFOR. Nicaragua.
- MIFIC (MINISTERIO DE FINANZAS Y COMERCIO).** 2005. Anuario Estadístico de Comercio Exterior. (<http://anuario.mific.gob.ni/statistics/50020102.shtml:13-Nov-2005>).
- MURILLO, T. M., y SUAREZ, M. A.** 2001. Inducción de callos y micropropagación a partir de yemas adventicias de dos cultivares de quequisque (*Xanthosoma* spp. (L.) Schott). Tesis (Ing. Agr.) Managua, Nicaragua.
- NDOUMOU, N. C., CHASE, A. R. y STALL, J. B.** 1995. Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological and fatty acid analysis. 82: 754-759.
- NGUYEN, T. Q. y NGUYEN, V. U.** 1987. Aroids propagation by tissue culture: I. Shoot tip culture and propagation of *Xanthosoma violaceum*. *HortScience* 22(3): 671-672.
- NYOCHEMBENG, L. y GARTON, S.** 1998. Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 127-134.
- NZIETCHENG, S.** 1983. La pourriture racinaire du macabo (*Xanthosoma sagittifolium*) au Cameroon; 1. Symptomatie et etiologie de la maladie. *Agronomie tropicale* 38, 321-325.
- NZIETCHUENG, S.** 1984. Root rot of *Xanthosoma sagittifolium* by *Pithium myriottylum* in Cameroon. In. *Tropical root crop: Production and uses in Africa*. Proceedings of the second Triennial Symposium of the International Society for Tropical Root Crops. (Eds. E.R. Terry, E. V. Doku, O. B. Arene y N. M. Mahungu). Doula, Cameroon, pp. 185-188.
- ONWUEME, I. C y CHARLES, W. B.** 1994. Cultivation of cocoyam. En: *Tropical root in tuber crops. Production, perspectives and future prospects*. FAO plant production and protection paper 126, Rome, pp. 139-161.

- PAIZ, E.** 2006. Organogénesis directa y embriogénesis indirecta en el cultivo de quequisque (*Xanthosoma spp.* L. Schott), cultivar Masaya. Tesis (Ing. Agr.) Managua, Nicaragua.
- PARRA, R.** 2002. Hormonas vegetales. En Revista de Biología, ciencias experimentales y de la salud. <http://www.biologia-en-internet.com/?Id=4&Fs=2>
- PÉREZ, J. N.** 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Ediciones GEO. Villa Clara, Cuba.
- PERNEEL, M.** 2006. The root pathogen *Phytium myriotylum* on cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Intraespecific variability and biological control. PhD Thesis. Ghent University, Belgium.
- PIERIK, R. L. M.** 1990. Rejuvenation and micropropagation. En: Progress in plant cellular and molecular biology (Eds. H. J. J. Nijkamp, L. H. W. van Der Plas y J. Van Aartrijk). London: Kluwer Academic Publishers, pp. 91-101.
- REYES, G.** 2006. Studies on cocoyam (*Xanthosoma spp.*) in Nicaragua with emphasis on dasheen mosaic virus. Uppsala, Suecia.
- REYES, G., y AGUILAR, M.D.** 2005. Reproducción acelerada de semilla de quequisque (*Xanthosoma spp.*) y malanga (*Colocasia sp.*) Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 11 Pág.
- REYES, G., y NYMAN, M.** 2006. Direct and indirect plant regeneration from meristem and apex of cocoyam (*Xanthosoma spp.*). En: Reyes. 2006. Studies on cocoyam (*Xanthosoma spp.*) in Nicaragua with emphasis on dasheen mosaic virus. Uppsala
- REYES, G. NYMAN, M. y RÖNNBERG A.C.** 2005. Agronomic performance of three cocoyam (*Xanthosoma violaceum* Schott) genotypes grown in Nicaragua. En: Studies on cocoyam (*Xanthosoma spp.*) in Nicaragua with emphasis on dasheen mosaic virus. Uppsala
- SABAPATHY S. y NAIR H.** 1995 *In vitro* propagation of taro, with spermine, arginine and ornithine II. Plantlet regeneration via callus. En: Plant Cell Reports 14: 520-524.
- SIMONE, G. W. y ZETTLER, F. W.** 1991. Dasheen mosaic virus disease of Araceous foliage plants. Plant pathology fact sheet. pp 42. University of Florida, USA.
- STRAUSS, M. S. y ARDITTI, J.** 1980. Plantlet regeneration from shoot tip culture of *Xanthosoma caracu*. Annals of Botany 45 (2): 209-212.
- TAMBOG, J.T., SAPRA, V. T y GARTON, S.** 1998. *In vitro* induction of tetraploids in cochicine- treated cocoyam plantlets. Euphytica 104, 191-197.
- TSALA, G. N. OMOKOLO, D. N y BALANGE, A. P.** 1996. *In vitro* cultures of cocoyam shoot tips, variation of phenol and protein contents and peroxidase and IAA- oxidase activities during adventitious bud formation. *Plant Peroxidase Newsletter* 8, 17-24.
- VUYLSTEKE, D.R.** 1998. Field Performance of banana micropropagules and somaclones. En: Somaclonal Variation and induced Mutation in Crop Improvement. (Eds) Current plant science and biotechnology in agriculture, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Great Britain, 219-231.
- VUYSLSTEKE, D. y DE LANGHE.** 1985. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. Trop. Agr (Trinidad) 62: 323-328.
- YAM, T. W., WEBB, E. L. y ARDITTI J.** 1990. Callus formation and plantlet development from axillary buds of taro, En: Planta (1990) 180. 458-460.

- ZELEDÓN, M. A.** 2006. Organogénesis directa y embriogénesis indirecta en el cultivo de quequisque (*Xanthosoma spp.* L. Schoot), cultivar Blanco. Tesis (Ing Agr) Managua, Nicaragua.
- ZOK S., SAMA A. E., NYUCHEMBENG, L., TAMBONG, J. T., NDZANA, X., y WUTOH, JG.** 1998. Rapid multiplication of root and tuber crops through tissue culture in Cameroon. *Cahier d'études et de recherches francophones/ Agricultures* 7 (1), 63-66

# **ANEXOS**

**Anexo 1.** Metodología para la preparación del extracto de quequisque (Yam *et al.*, 1990).

El extracto de quequisque fue preparado hirviendo 600 g de quequisque fresco fraccionado (1 cm<sup>3</sup>) en 1000 ml de agua destilada por 5 minutos y mantenido en fuego lento por 1 hora. El caldo fue filtrado utilizando Filtros Whatman No 1.

**Anexo 2.** Análisis estadístico de los datos del tamaño de callos de los cultivares de quequisque Bco, CS, SR, LE y TC por cultivar y en cada medio de cultivo.

<b>Cultivar</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Escala</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Medios de cultivo</b>	<b>Escala</b>
Blanco	II b	Grande Mediano a Pequeño b $P = 0.000$	La Escalera	II c	Grande Mediano Pequeño
	III a	Grande Mediano a Pequeño b $P = 0.001$		III b	Grande Mediano b Pequeño a $P = 0.002$
	IV a	Grande a Mediano b Pequeño b $P = 0.011$		IV c	Grande Mediano Pequeño
	Va	Grande a Mediano b Pequeño a $P = 0.002$		V a	Grande a Mediano b Pequeño b $P = 0.000$
		DSM: 0.1263			DSM: 0.1133
Casitas	II ab	Grande Mediano a Pequeño b $P = 0.003$	Ticuantepe	II c	Grande Mediano Pequeño
	III c	Grande Mediano a Pequeño b $P = 0.014$		III b	Grande Mediano b Pequeño a $P = 0.008$
	IV a	Grande b Mediano a Pequeño b $P = 0.000$		IV b	Grande Mediano b Pequeño a $P = 0.001$
	V ab	Grande Mediano a Pequeño b $P = 0.001$		V a	Grande a Mediano b Pequeño c $P = 0.005$
		DSM: 0.2107			DSM: 0.1731
San Ramón	II b	Grande Mediano Pequeño			
	III b	Grande Mediano Pequeño			
	IV b	Grande Mediano Pequeño			
	V a	Grande a Mediano c Pequeño b $P = 0.000$			
		DSM: 0.0386			

DSM: diferencia mínima significativa,  $P$  = probabilidad

**Cuadro 11.** Datos numéricos de figura 3. Estructuras desarrolladas de los callos inducidos en la fase de regeneración de plantas en el medio MS sin reguladores de crecimiento a los 15, 45 y 80 días en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC.

Cultivares	15 días				45 días				80 días			
	C	C+R	M	P	C	C+R	M	P	C	C+R	M	P
Blanco	100				80	5	10	5		20	60	20
Casitas	65		35		30		70		10		90	
San Ramón	100				30	5	55	10	20	15	50	15
La Escalera	100				15		65	20			70	30
Ticuan-tepe	60	5	35		10		85	5	5		80	15

**Cuadro 12.** Datos numéricos de la figura 5. Porcentaje de sobrevivencia de callos multiplicados en los medios de cultivo II, III, IV y V en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC a los 65 días.

Cultivares	Medios de cultivo			
	II	III	IV	V
Blanco	80.9	63.2	52.6	72.2
Casitas	50.0	35.0	95.0	60.0
San Ramón	33.3	61.5	50.0	90.0
La Escalera	100.0	91.8	100.0	90.0
Ticuan-tepe	75.0	50.0	75.0	93.8

**Cuadro 13.** Datos numéricos de la figura 6 porcentaje de callos friables y acuosos obtenidos en los cultivares de quequisque (*Xanthosoma* spp.) Bco, CS, SR, LE y TC en los medios de cultivo II, III, IV y V a los 65 días

Medios de cultivo	Blanco		Casitas		San Ramón		La Escalera		Ticuan-tepe	
	Friable	Acuoso	Friable	Acuoso	Friable	Acuoso	Friable	Acuoso	Friable	Acuoso
II	94.1	5.9		100		100.0	33.3	66.67		100
III	100		28.6	71.4	37.5	62.5	36.4	63.63	75	25
IV	100		94.7	5.26	37.5	62.5	50	50	66.67	33.33
V	100		91.7	8.33	73.7	26.32	88.89	11.11	100	

**Cuadro 14.** Datos numéricos de la figura 7 tamaño promedio (cm) de callos de los cultivares de quequisque (*Xanthosoma* spp.) Bco, Cs, SR, LE y TC en cuatro medios de cultivo II, III, IV y V.

**Blanco**

	II	III	IV	V
Pequeño (0.1- 0.5 cm)	17.7	33.3	20	46.2
Mediano (0.5-1.0 cm)	82.3	66.7	20	7.7
Grande (1.0-2.5 cm)			60	46.2

**Casitas**

	II	III	IV	V
Pequeño (0.1- 0.5cm)	70	85.7	21.1	
Mediano (0.5-1 cm)	30	14.3	57.9	33.3
Grande (1-2.5cm)			21.1	66.7

**La Escalera**

	II	III	IV	V
Pequeño (0.1- 0.5cm)	100	90.9	100	22.2
Mediano (0.5-1 cm)		9.1		22.2
Grande (1-2.5cm)				55.6

**San Ramón**

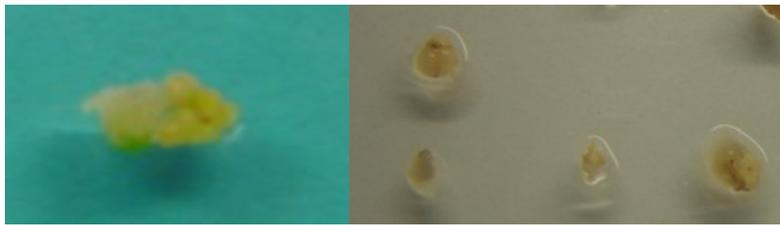
	II	III	IV	V
Pequeño (0.1- 0.5cm)	100	100	100	31.6
Mediano (0.5-1 cm)				15.8
Grande (1-2.5cm)				52.6

**Ticuan-tepe**

	II	III	IV	V
Pequeño (0.1- 0.5cm)	100	87.5	75	13.3
Mediano (0.5-1 cm)		12.5	25	26.7
Grande (1-2.5cm)				60

**Cuadro 15.** Datos numéricos de la figura 8. Callos en crecimiento, multiyemas, plantas y callos sin crecimiento registradas a los 50 días en los cultivares Bco, CS, SR, LE y TC que fueron multiplicados en los medios de cultivo II, III, IV y V establecidos en el medio MS sin reguladores de crecimiento.

Cultivares	Callo				Multiyema				Plantas				Sin crecimiento			
	M2	M3	M4	M5	M2	M3	M4	M5	M2	M3	M4	M5	M2	M3	M4	M5
Blanco	55	75	25	25		5	20	70	5		10		40	20	45	5
Casitas	54.5	60	55	40			10	45				10	45	40	35	5
San Ramón	100	33.3	18.2	15		33.3	18.2	50				35		33.3	63.6	
La Escalera	64.3	38.9	56.3	45	35.7	33.3	43.8					55		27.8		
Ticuantepé	27.8	45	35	55	33.3	40	35	10				15	39	15	30	20



**Figura 11.** a) Callo friable; b) callos acuosos



**Figura 12.** Callos friables del cultivar Casita en el medio de multiplicación IV a los 65 días.



**Figura 13.** Plantas, multiyemas y callo con raíz de LE-V a los 65 días



**Figura 14.** Hojas con forma de basto



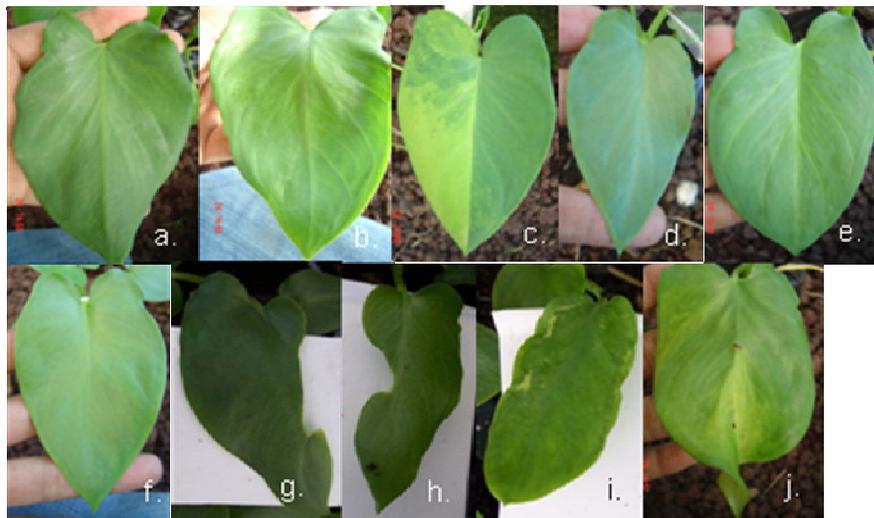
**Figura 15.** Hojas redondeadas



**Figura 16.** Hojas alargadas



**Figura 17.** Hojas sin lóbulo



**Figura 18.** a) y b) Borde rugoso; c) decoloración; d), e), f), g), h) e i) deformación en el lóbulo; j) punta enrollada