

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**

**ESCUELA DE PRODUCCION VEGETAL**

**TRABAJO DE DIPLOMA**

**EFEECTO DE LOS FACTORES NUTRICIONALES  
EN LA PROPAGACION *IN VITRO* DE  
QUEQUISQUE ( *Xanthosoma sagittifolium* L. )**

**AUTOR : EDITH DEL SOCORRO MENDEZ VILLANUEVA**

**ASESOR : ING. AGR. MSc. JOSE DOLORES CISNE CONTRERAS**

**MANAGUA, NICARAGUA**

**1997**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**

**ESCUELA DE PRODUCCION VEGETAL**

**TRABAJO DE DIPLOMA**

**EFECTO DE LOS FACTORES NUTRICIONALES  
EN LA PROPAGACION *IN VITRO* DE  
QUEQUISQUE ( *Xanthosoma sagittifolium* L. )**

**AUTOR : EDITH DEL SOCORRO MENDEZ VILLANUEVA**

**ASESOR : ING. AGR. MSc. JOSE DOLORES CISNE CONTRERAS**

**TRABAJO PRESENTADO A LA CONSIDERACION DEL HONORABLE TRIBUNAL  
EXAMINADOR COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO DE  
INGENIERO AGRONOMO**

**MANAGUA, NICARAGUA**

**1997**

## **DEDICATORIA**

Con mucho amor a mis padres Rosa María Villanueva de Méndez y Juan Francisco Méndez López porque este trabajo es resultado de todo el amor, esfuerzo, responsabilidad y entrega diaria que me han dado. Gracias padres por todo su apoyo. Sin ustedes esto no sería una realidad.

A mis hermanas Rosa María Méndez de L. y María José Méndez V. Su amor y sobre todo su amistad me fortalece.

## AGRADECIMIENTOS

- A Dios por permitirme vivir y disfrutar de estos momentos tan importantes junto a todas las personas que amo.
- Al Ing. Agr. José Dolores Cisne C. por ser la guía y respaldo en mi trabajo. Por ser más que profesor, mi amigo.
- Al Ing. Agr. Julio C. Luna Cuadra por todo el amor y la amistad compartida durante tantos años.
- A todos los profesores que contribuyeron con mi educación.
- A los Ing. Agr. Marbell Aguilar y Guillermo Reyes que siempre estuvieron dispuestos a compartir sus conocimientos.
- A todo el personal del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses, en especial a doña Esmelda Bobadilla Bravo.
- A todos los trabajadores de la biblioteca especialmente a Dilma y Katty por estar siempre dispuestas a brindarme toda la información que necesité.
- Al Ing. Agr. Julio C. Miranda D. por ser pieza clave en la culminación de este trabajo. Su experiencia y sus orientaciones me fueron de mucha ayuda.
- A todos mis amigos que colaboraron de manera directa o indirecta en la realización de este trabajo.

# INDICE GENERAL

CONTENIDO	Pag.
- INDICE DE TABLAS.....	i
- INDICE DE FIGURAS.....	iii
- RESUMEN.....	vi
I- INTRODUCCION.....	1
II- MATERIALES Y METODOS.....	4
2.1- Descripción del estudio.....	4
2.2- Esterilización de materiales y equipos.....	4
2.3- Obtención y preparación del material vegetativo...	5
2.4- Etapa I: Efecto de diferentes grados de pH en el cultivo <i>in vitro</i> de quequisque.....	5
2.5- Etapa II: Efecto de macro y micronutrientes.....	10
2.6- Etapa III: Efecto de sacarosa, agua de coco y vitamina .....	14
III- RESULTADOS.....	17
3.1- Efecto de diferentes grados de pH en el cultivo <i>in vitro</i> de quequisque.....	17
3.1.1- Altura de planta.....	17
3.1.2- Número de raíces.....	18
3.1.3- Número de hojas.....	19
3.1.4- Número de hijos.....	19
3.2- Efecto simple y de interacción de diferentes porcentajes de macro y micronutrientes.....	21
3.2.1- Altura de planta.....	21
3.2.2- Número de raíces.....	22
3.2.3- Número de hojas.....	24

3.2.4- Número de hijos.....	24
3.3- Efecto simple y de interacción de diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitamina a través del tiempo.....	26
3.3.1- Altura de planta.....	26
3.3.2- Número de raíces.....	32
3.3.3- Número de hojas.....	45
3.3.4- Número de hijos.....	49
<b>IV- DISCUSION.....</b>	<b>57</b>
4.1- Efecto de diferentes grados de pH en el cultivo <i>in vitro</i> de quequisque.....	57
4.2- Efecto simple y de interacción de diferentes porcentajes de macro y micronutrientes.....	60
4.3- Efecto simple y de interacción de diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitamina a través del tiempo.....	63
<b>V- CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>VI- RECOMENDACIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>VII- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>73</b>

## INDICE DE TABLAS

TABLA	PAGINA
1. Constituyentes del medio básico Murashige y Skoog.....	6
2. Constituyentes adicionales al medio básico (MS) para la micropropagación de <i>X. sagittifolium</i> .....	6
3. Niveles y tratamientos utilizados para el estudio del factor pH.....	8
4. Cantidad de soluciones madres por tratamiento, usadas para evaluar el efecto de los porcentajes de macro y micronutrientes.....	11
5. Arreglo de los tratamientos en estudio según las concentraciones de macro y micronutrientes.....	12
6. Arreglo de los tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitamina días después de la inoculación.....	16
7. Promedios de altura, número de raíces, número de hojas y número de hijos en medios de cultivo a diferentes concentraciones de macro y micronutrientes en estudio.....	21
8. Comportamiento de la altura de planta bajo la influencia del efecto simple de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo.....	28
9. Altura de planta promedio en los medios de cultivo donde hubo efecto de interacción sacarosa * agua de coco * vitamina.....	29
10. Número de raíces promedios por planta obtenidos en los medios de cultivo bajo el efecto simple de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo.....	33

11. Número de raíces promedio en el medio de cultivo bajo la interacción sacarosa *agua de coco.....	35
12. Número de raíces promedio por planta obtenidas en los medios de cultivo bajo la interacción sacarosa * agua de coco*vitamina.....	36
13. Comportamiento de la variable número de raíces bajo la interacción sacarosa*tiempo.....	40
14. Comportamiento de la variable número de raíces bajo la interacción agua de coco*tiempo.....	41
15. Número promedio de raíces por planta en los medios de cultivo bajo la interacción sacarosa*agua de coco*tiempo..	42
16. Número promedio de hojas por planta en el medio de cultivo MS bajo el efecto simple de diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitamina días después de la inoculación.....	46
17. Comportamiento del número de hojas promedio por planta en un medio de cultivo bajo el efecto de la interacción sacarosa*vitamina.....	47
18. Número de hojas promedio por planta bajo el efecto de la interacción sacarosa*tiempo.....	48
19. Número promedio de hijos por planta desarrolladas en un medio de cultivo bajo el efecto simple diferentes concentraciones de sacarosa*agua de coco*vitamina y tiempo.....	50
20. Número promedio de hijos por planta obtenidos en un medio MS bajo la interacción de diferentes niveles de sacarosa * agua de coco.....	52
21. Número promedio de hijos por planta bajo la interacción agua de coco*vitamina.....	53
22. Número promedio de hijos por planta bajo la interacción sacarosa*agua de coco*vitamina.....	54



## INDICE DE FIGURAS

FIGURA	Pag.
1- Efecto del diferentes grados pH sobre el incremento en la altura de plantas de quequisque cultivadas <i>in vitro</i> a la semanas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de evaluación.....	17
2- Efecto del pH sobre el incremento en número de raíces por planta de quequisque cultivadas <i>in vitro</i> en las semanas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de evaluación.....	18
3- Efecto del pH sobre el incremento en número de hojas por planta de quequisque cultivadas <i>in vitro</i> en las semanas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de evaluación.....	19
4- Efecto del pH sobre el incremento en número de hijos por planta de quequisque cultivadas <i>in vitro</i> en las semanas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de evaluación.....	20
5- Efecto de diferentes concentraciones de macronutrientes sobre el número de hojas y raíces por planta en cultivo <i>in vitro</i> de quequisque .....	23
6- Altura de planta bajo la influencia del efecto simple de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo.....	28
7- Altura de planta bajo la influencia de la interacción de 15 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina.....	30
8- Altura promedio de planta obtenido en un medio de cultivo bajo la interacción de 30 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina.....	31

9- Altura promedio de planta obtenida en los medios de cultivo bajo la influencia de la interacción de 45 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina.....	32
10-Efecto simple de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo sobre el número promedio de raíces por planta.....	34
11-Número promedio de raíces por planta obtenidas en los medios de cultivo bajo la interacción sacarosa*agua de coco.....	35
12-Efecto de la interacción 15 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina sobre la variable número de raíces.....	37
13-Efecto de la interacción 30 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina sobre la variable número de raíces.....	38
14-Efecto de la interacción 45 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina sobre la variable número promedio de raíces por planta.....	39
15-Número promedio de raíces por planta bajo la interacción sacarosa*tiempo.....	40
16-Número de raíces bajo la interacción agua de coco*tiempo ..	41
17-Número promedio de raíces por planta en los medios de cultivo bajo la interacción de 15 g/l de sacarosa con tres niveles de agua de coco días después de la inoculación.	43
18-Número de raíces promedio por planta en medios de cultivo bajo la interacción de 30 g/l de sacarosa con tres niveles de agua de coco días después de la inoculación.....	44

19-Número de raíces bajo la interacción de 45 g/l de sacarosa con tres niveles de agua de coco a través del tiempo.....	45
20-Efecto simple de tres niveles de sacarosa, agua de coco y tiempo sobre el número de hojas.....	46
21-Número promedio de hojas por planta en un medio de cultivo bajo las interacción sacarosa*vitamina.....	48
22-Número de hojas promedio por planta bajo la interacción sacarosa* tiempo.....	49
23-Efecto simple de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo sobre el número promedio de hijos por planta.....	51
24-Número promedio de hijos por planta bajo la interacción sacarosa*agua de coco.....	52
25-Número promedio de hijos por planta bajo la interacción agua de coco*vitamina.....	53
26-Número promedio de hijos por planta bajo la interacción 15 g/l de sacarosa con diferentes niveles de agua de coco y vitamina.....	55
27-Número promedio de hijos por planta bajo la interacción 30 g/l de sacarosa con diferentes niveles de agua de coco y vitamina .....	56
28-Número de hijos bajo la interacción 45 g/l de sacarosa con diferentes niveles de agua de coco y vitamina.....	57

## RESUMEN

Esta investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) en la Universidad Nacional Agraria, con el objetivo de determinar el medio de cultivo apropiado en la micropropagación de *Xanthosoma sagittifolium* L. mediante la determinación del efecto del pH, macro y micronutrientes, sacarosa, agua de coco y vitamina. El estudio se realizó en tres etapas. En cada una se utilizó un diseño completamente aleatorizado (DCA) para evaluar las variables: altura de planta, número de raíces, número de hojas y número de hijos. En la primera etapa se evaluaron cinco grados de pH. Se estudiaron los pH 3.7, 4.7, 5.7, 6.7 y 7.7. Se hizo un análisis de regresión que demostró que pH entre 5.7 y 6.7 produjeron los mejores resultados en todas las variables evaluadas. En la segunda etapa se evaluaron las concentraciones 50, 90 y 130 % de macro y micronutrientes utilizadas en el medio nutritivo Murashige y Skoog. Se hizo un análisis de varianza (ANDEVA) y no se encontró efecto significativo en los porcentajes de micronutrientes estudiados ni en la interacción entre macro y micronutrientes. Sin embargo, los macronutrientes presentaron efecto significativo en el número de hojas y raíces, obteniendo los mejores resultados con el 50% de macronutrientes. En la tercera etapa se estudió el efecto de diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitamina días después de la inoculación. El análisis de varianza realizado indicó que la sacarosa presentó efecto significativo en

todas las variables estudiadas. Con 30 g/l de sacarosa se obtuvo el mayor promedio de altura de planta y el mayor número de hijos. Con 45 g/l el mayor número de raíces y el mayor número de hojas se obtuvo con 15 g/l. El agua de coco presentó efecto significativo en todas las variables. El uso de 150 ml/l de agua de coco produjo los mejores promedios en altura de planta, número de raíces y número de hijos; sin embargo con 50 ml/l se obtuvo el mayor número de hojas. La vitamina B12 (tiamina HCl) presentó efecto simple significativo en las variables altura de planta y número de hijos obteniendo los mayores promedios con 10 ml/l. En el número de hojas presentó efecto en interacción con la sacarosa y en el número de raíces no hubo efecto significativo.

## I. INTRODUCCION

El quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* L.) pertenece a la familia Aráceae. Es originario de América (Montaldo, 1983). Los géneros comestibles de la familia Aráceae como el *Xanthosoma* se cultivan como una fuente importante de alimentos e ingresos en diversas regiones tropicales y subtropicales (Onwene, 1978; Wong, 1986).

El cultivo del quequisque presenta varias cualidades que han permitido su desarrollo: alto potencial de rendimiento, alto poder de conservación en condiciones naturales, tamaño extremadamente pequeño del grano de almidón (Blanco, 1992).

En América los principales países productores son: República Dominicana, Venezuela, Costa Rica e Islas del Caribe. En Nicaragua las principales zonas productoras son: El Rama, Río San Juan y Nueva Guinea, pero también se puede encontrar pequeñas áreas en los departamentos de Carazo, Masaya y Rivas (Blanco, 1992).

En nuestro país el quequisque es uno de los cultivos de agroexportación más importantes, con un área sembrada de 430 ha en 1995 y 570 ha en 1996 (Coronel, 1996). Como producto de exportación no tradicional generó en 1996 US\$ 3,060,000 en divisas al país.

El sistema de propagación vegetativa por cormos, usado normalmente en la mayoría de las aráceas comestibles, ha

contribuido a que los agricultores sufran serias pérdidas por la diseminación y generalización de enfermedades, entre las que se destacan las infecciones virales, siendo el virus del mosaico de la malanga (DMV) el de mayor relevancia (Hartman, 1974; Monge et al., 1987).

Esta problemática plantea la necesidad de aplicar técnicas que permitan el fomento de este cultivo y den al agricultor la oportunidad de obtener cosechas rentables como resultado de siembra de semilla sana y vigorosa (obtenida de cultivos de tejidos).

En la actualidad la propagación *in vitro* se practica con éxito en especies hortícolas (Murashigue, 1978); ornamentales (Hughes, 1981) y más recientemente en especies leñosas (Thorpe, 1983). En algunas especies, esta metodología ha demostrado importantes ventajas en comparación con los sistemas convencionales de propagación (Villalovos y Thorpe, 1991); las más importantes son: incremento acelerado del número de plantas derivadas por genotipo, reducción del tiempo de multiplicación, posibilidad de multiplicar grandes cantidades de plantas en una superficie reducida a bajos costos y en términos económicamente costeables, mayor control sobre la sanidad del material que se propaga, facilidad para transportar el material *in vitro* de un país a otro con menos restricciones aduaneras, posibilidad de multiplicar rápidamente una variedad de la cual solo existían pocos individuos.

La producción *in vitro* está influenciada por muchos factores, incluyendo la luz (Novak y Petru, 1981; Pierik y Ruibing, 1973), el medio de cultivo (Hussey, 1978; Pierik y Woets, 1971) y los reguladores de crecimiento (Levy et al; 1973; Takayama y Misawa, 1982).

En este estudio el objetivo general fue determinar el medio de cultivo más apropiado en la micropropagación de quequisque además de cumplir con los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el efecto de diferentes grados de pH en la multiplicación *in vitro* de quequisque.
- Cuantificar el efecto simple y la interacción de diferentes porcentajes de macro y micronutrientes en la multiplicación *in vitro* de quequisque.
- Medir el efecto simple y la interacción de diferentes concentraciones de azúcar, agua de coco y vitaminas en la multiplicación *in vitro* de quequisque.



## **II.MATERIALES Y METODOS**

### **2.1-Descripción del estudio**

El presente estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria (UNA) ubicada en el km 12 1/2 carretera norte, Managua, Nicaragua, en el período comprendido de enero a agosto de 1995.

El estudio se desarrolló en tres etapas. En la primera etapa se determinó el efecto del pH en la micropropagación de quequisque. En la segunda etapa se identificó el efecto simple y de interacción de los porcentajes de macro y micronutrientes. En la tercera etapa se evaluó el efecto simple y de interacción de diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitaminas.

### **2.2- Esterilización de materiales y equipos**

Los tubos de ensayo fueron lavados con detergente, enjuagados con abundante agua, se dejaron escurrir y luego se esterilizaron en el autoclave a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Las pinzas, escalpelos y platos petri fueron esterilizados en el horno a 180 °C durante 40 minutos.

Una vez preparado el medio nutritivo y distribuido en los tubos de ensayo, fue esterilizado en el autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos.

La cámara de flujo laminar se limpió con alcohol al 70% y se esterilizó con luz ultravioleta durante 30 minutos antes de proceder con la inoculación de los explantes.

### **2.3- Obtención y preparación del material vegetativo**

El material vegetativo utilizado en la realización de este trabajo fue tomado de plantas ya establecidas *in vitro* provenientes de la introducción de ápices caulinares.

Una vez seleccionado al azar el material vegetativo fue llevado al cuarto de transferencia. En la cámara de flujo laminar dichas plantas fueron puestas en platos petri y con ayuda de pinzas y escalpelos fueron decapitadas, se les eliminaron las raíces y se dejaron a un tamaño aproximado de 0.5 cm para luego ser sembradas individualmente con todas las condiciones asépticas en tubos de ensayo, conteniendo cada uno 10 ml de medio nutritivo.

### **2.4-Etapa I: Efecto de diferentes grados de pH en el cultivo *in vitro* de quequisque.**

#### **2.4.1-Preparación del medio de cultivo**

En la tabla 1 se muestra la composición y volúmenes usados en la preparación de un litro de medio basal.

**TABLA 1: Constituyentes del medio básico Murashige y Skoog.**

SOLUCION	CONSTITUYENTES	SOLUCION MADRE (mg/l)	CONCENTRACION FINAL (mg/l)	SOLUCION MADRE POR MEDIO BASAL (ml/l)
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82,500	1,650	20
	KNO <sub>3</sub>	95,000	19,000	
	Mg SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	18,500	370	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8,500	170	
2	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620	6.2	1
	Mn SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	2,176	22.3	
	Zn SO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	860	8.6	
	Na MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	25	0.25	
	Cu SO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	2.5	0.025	
	Co Cl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	2.5	0.025	
3	KI	75	0.83	1
4	Ca Cl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	16,000	440	2.9
5	Na <sub>2</sub> EDTA	7,480	7,480	6
	Fe SO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	5,570	5,570	
6	Tiamina HCl	100	100	10
7	Mionositol	100	100	

FUENTE : Murashige y Skoog, 1962.

Además de los nutrientes que componen el medio basal, se adicionaron los constituyentes que se observan en la tabla 2.

**TABLA 2: Constituyentes adicionados al medio básico (MS) para la micropropagación de *X. sagittifolium* (Salazar, 1991).**

Constituyentes	cant./l MS
Agua de coco	100 ml
BAP	3 mg
Sacarosa	30 g
gelificante	7 g

#### **2.4.1.1- Preparación del medio basal (MS)**

Con ayuda de pipetas se tomaron cada una de las soluciones madres que serían usadas en la preparación del medio básico. Se diluyeron en beakers con agua destilada y desionizada.

Con una probeta se agregó el total de agua destilada y desionizada necesaria para completar la cantidad de medio a preparar. Se añadió la cantidad de sacarosa necesaria y se disolvió en el agitador magnético; una vez preparado el medio nutritivo se ajustó el pH al nivel deseado con KOH o HCl al 0.5 N.

Después de ajustar el pH, la solución se calentó en un mechero para disolver más fácilmente el agar, una vez disuelto se distribuyeron inmediatamente 10 ml/l de solución en cada tubo de ensayo.

Los tubos se introdujeron en el autoclave y se esterilizó el medio a 121 °C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Luego se dejaron reposar en gradillas hasta que se logró enfriar para proceder a la inoculación de los explantes.

#### **2.4.2- Establecimiento de los explantes**

Tan pronto se realizó la inoculación de los explantes con ayuda de pinzas y escalpelos sobre platos petri en la cámara de flujo laminar, los tubos de ensayo se sellaron con cinta de

parafina para garantizar la esterilidad del material; se depositaron en gradillas y se trasladaron a un cuarto de crecimiento. En este lugar permanecieron durante 6 semanas consecutivas en condiciones ambientales controladas. Durante este período la temperatura fue de  $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , intensidad lumínica de 2500 lux, humedad relativa (HR) de 70-80% y fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad.

#### 2.4.3-Diseño experimental y análisis estadístico

Los tratamientos se establecieron en un diseño de regresión con un solo factor de estudio (factor A:pH) y 5 niveles de dicho factor (tabla 3). Cada tratamiento correspondió a un nivel de pH. Se utilizaron 10 repeticiones por cada tratamiento.

El análisis estadístico realizado fue una regresión.

**Tabla 3: Niveles y tratamientos utilizados para el estudio del factor pH.**

TRATAMIENTO	NIVEL	pH
1	A <sub>1</sub>	3.7
2	A <sub>2</sub>	4.7
3	A <sub>3</sub>	5.7
4	A <sub>4</sub>	6.7
5	A <sub>5</sub>	7.7

El pH deseado se obtuvo adicionando Hidróxido de Potasio (KOH) ó Acido Clorhídrico (HCl) con una concentración de 0.5 N al medio nutritivo antes de su esterilización en el autoclave.

#### **2.4.4- Variables evaluadas**

La toma de datos se realizó durante seis semanas continuas en las cuales se evaluaron las siguientes variables:

**a- Altura de planta (cm):** Con una regla milimetrada se midió sobre la superficie del tubo de ensayo desde la base del tallo, hasta el ápice de ésta.

**b- Número de raíces:** Se contabilizó visualmente todas las raíces formadas a partir de la planta madre, excluyendo las raíces que pudieran desarrollarse a partir de hijos.

**c- Número de hojas:** Se contabilizó visualmente todas las hojas formadas durante el período establecido sin descartar las que murieron en ese lapso.

**d- Número de hijos:** Se contabilizó visualmente el número de hijos que presentó cada explante. Se consideró como hijos a cada uno de los brotes que se diferenciaron a partir del explante establecido inicialmente.

## **2.5. Etapa II: Efecto de macro y micronutrientes.**

### **2.5.1- Preparación del medio del cultivo**

En la segunda etapa del estudio se evaluó el efecto simple y la interacción de diferentes concentraciones de macro y micronutrientes por lo que el medio básico de Murashige y Skoog (1962) fue modificado en dependencia de los tratamientos que fueron aplicados.

Las cantidades de soluciones madres usadas para cada tratamiento pueden ser observadas en la tabla 4.

Las cantidades de agua de coco, BAP, sacarosa y gelificante (bacto agar) se mantuvieron iguales que en el acápite 2.4 (tabla 2) debido a que no fueron sujetos de estudio. El pH usado en este medio nutritivo fue de 6.7, el cual produjo los mejores resultados en la etapa I.

Una vez preparados los medios nutritivos de cada tratamiento fueron esterilizados usando los métodos convencionales de esterilización de materiales y equipos.

**Tabla 4. Cantidad de soluciones madres por tratamiento, usadas para evaluar el efecto de los porcentajes de macro y micronutrientes.**

SOL./TRAT.	CANTIDAD DE SOLUCION ( ml/ l )/ CADA TRATAMIENTO								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1*	10	26	10	26	18	18	10	26	18
2	0.5	0.5	1.3	1.3	0.5	1.3	0.9	0.9	0.9
3	1.5	1.5	3.9	3.9	1.5	3.9	2.7	2.7	2.7
4	1.5	1.5	3.9	3.9	1.5	3.9	2.7	2.7	2.7
5	2.5	2.5	6.5	6.5	2.5	6.5	4.5	4.5	4.5
6	5	5	13	13	5	13	9	9	9
7	6.2	6.2	16.2	16.2	6.2	16.2	11.2	11.2	11.2

\*Las soluciones fueron tomadas del medio MS.

#### 2.5.2- Diseño experimental y análisis estadístico.

El ensayo se estableció en un diseño completamente aleatorizado (DCA) en un arreglo bifactorial. Los niveles para cada factor en estudio fueron :

Factor A: Concentración de macronutrientes.

Niveles del factor A:  $a_1 = 50\%$

$a_2 = 90\%$

$a_3 = 130\%$



Factor B: Concentración de micronutrientes.

Niveles del factor B:  $b_1 = 50\%$

$b_2 = 90\%$

$b_3 = 130\%$

Realizando todas las combinaciones posibles entre los niveles del factor "A" y el factor "B" resultaron 9 tratamientos (tabla 5). Cada tratamiento constó de cinco repeticiones. Cada repetición estaba representada por una planta previamente preparada para la siembra individual en tubos de ensayo.

**Tabla 5. Arreglo de los tratamientos en estudio según las concentraciones de macro y micronutrientes.**

TRATAMIENTO	% MACRONUTRIENTES	% MICRONUTRIENTES.
1	50	50
2	130	50
3	50	130
4	130	130
5	90	50
6	90	130
7	50	90
8	130	90
9	90	90

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANDEVA) haciendo una separación de medias de DUNCAN con un nivel de significancia de 5%.

### **2.5.3- Variables evaluadas.**

Para conocer el efecto simple y de interacción de diferentes concentraciones de macro y micronutrientes se evaluaron las variables: altura de planta (cm), número de hijos, número de hojas y número de raíces.

Los datos fueron recopilados semanalmente durante un período de 6 semanas consecutivas.

La forma de evaluación y las consideraciones tomadas son iguales que en la etapa I.

**2.6. Etapa III: Efecto simple y de interacción de diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitaminas días después de la inoculación.**

**2.6.1- Preparación del medio de cultivo.**

En la tercera etapa del estudio se evaluó el efecto simple y de interacción de vitaminas, agua de coco y sacarosa en el medio básico (MS). La vitamina evaluada fue la B-12 (Tiamina HCl). Las demás soluciones madres del medio básico (MS) se mantuvieron constantes.

Una vez preparado el material vegetativo y las soluciones nutritivas respectivas a cada tratamiento, se procedió al establecimiento de los explantes de igual forma que en las etapas I y II.

**2.6.2- Diseño experimental y análisis estadístico.**

Se estableció un diseño completo al azar (DCA) en un arreglo tetrafactorial. Los niveles estudiados para cada factor fueron los siguientes:

**Factor A: Concentración de sacarosa.**

Niveles del factor A:  $a_1 = 15$  g/l.

$a_2 = 30$  g/l.

$a_3 = 45$  g/l.

Factor B: Concentración de agua de coco.

Niveles del factor B:  $b_1 = 50$  ml/l.

$b_2 = 100$  ml/l.

$b_3 = 150$  ml/l.

Factor C: Concentración de vitaminas (Tiamina HCl)

Niveles del factor C:  $c_1 = 5$  ml/l.

$c_2 = 10$  ml/l.

$c_3 = 15$  ml/l.

Factor D: Dias después de la inoculación (ddi)

Niveles del factor D:  $d_1 = 7$  ddi       $d_4 = 28$  ddi

$d_2 = 14$  ddi       $d_5 = 35$  ddi

$d_3 = 21$  ddi       $d_6 = 42$  ddi

Como resultado de realizar todas las combinaciones posibles entre los niveles de cada factor obtuvimos 27 tratamientos (tabla 6). Cada tratamiento fue estudiado a partir de 5 repeticiones durante un período de 6 semanas.

**Tabla 6. Arreglo de los tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitamina días después de la inoculación.**

SACAROSA (g/l)	AGUA DE COCO (ml/l)			VITAMINA (ml/l)
	50	100	150	
15	*T1	T4	T7	5
15	T2	T5	T8	10
15	T3	T6	T9	15
30	T10	T13	T16	5
30	T11	T14	T17	10
30	T12	T15	T18	15
45	T19	T22	T25	5
45	T20	T23	T26	10
45	T21	T24	T27	15

\* T = TRATAMIENTO.

Aplicados los tratamientos y recopilados los datos, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), posteriormente una separación de medias de DUNCAN con un nivel de significancia de 5% para determinar en cual de los tratamientos existió diferencias estadísticas significativas.

### 2.6.3- Variables evaluadas.

Las variables evaluadas para conocer el efecto simple y de interacción de diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitaminas fueron : altura de planta, número de raíces, número de hojas y número de hijos.

### III. RESULTADOS

#### 3.1- Efecto de diferentes grados de pH en el cultivo *in vitro* de quequisque.

##### 3.1.1- Altura de planta.

El análisis de regresión realizado a la variable altura de planta demuestra que las mayores alturas se alcanzaron con un rango de pH que va de 5.7 a 6.7., pH mayores de 6.7 reducen la altura en las plantas de quequisque (figura 1).

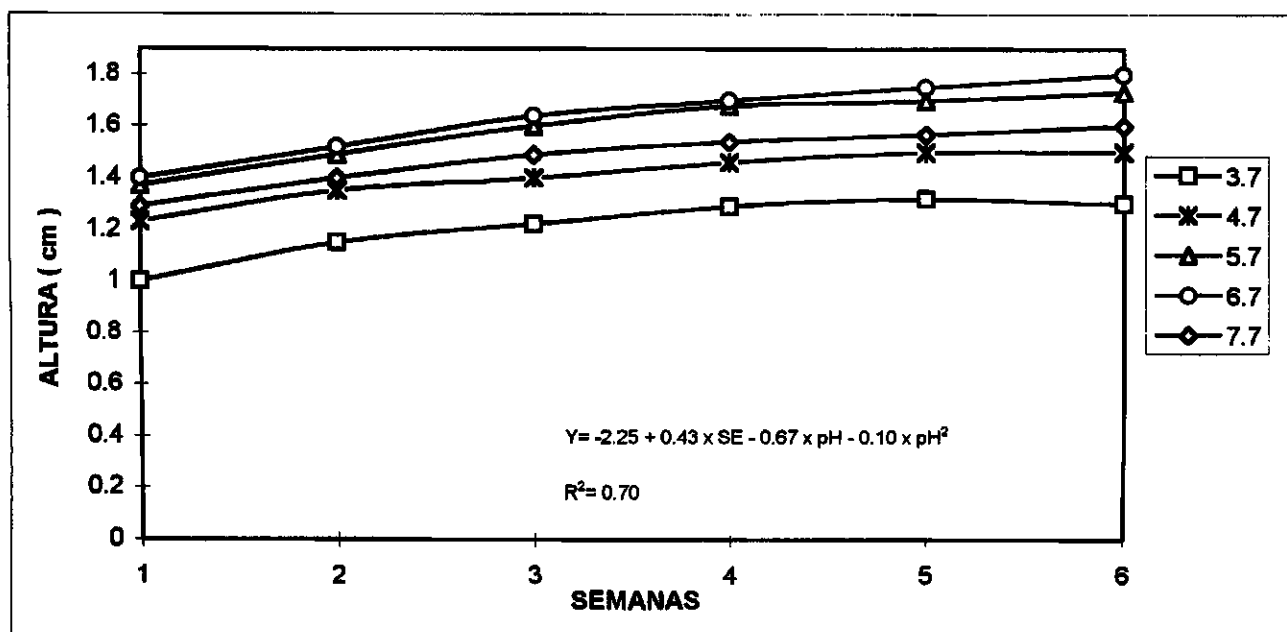


Figura 1. Efecto de diferentes grados de pH sobre el incremento en la altura de plantas de quequisque cultivadas *in vitro* en las semanas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de evaluación.

### 3.1.2-Número de raíces.

En el análisis estadístico realizado a los datos de la variable número de raíces determinó que el pH interactúa con el tiempo y que tuvo un efecto cuadrático.

Como se puede apreciar en la figura 2, el número de raíces se fue incrementando en el tiempo (semana a semana) variando en dependencia del pH del medio nutritivo. La mayor formación de raíces, 7.8 raíces en promedio por planta, se observó en la sexta semana después de la inoculación del explante y en un pH entre 5.7 y 6.7; pH menores de 5.7 o mayores de 6.7 indujeron a la producción de menor número de raíces por planta (figura 2).

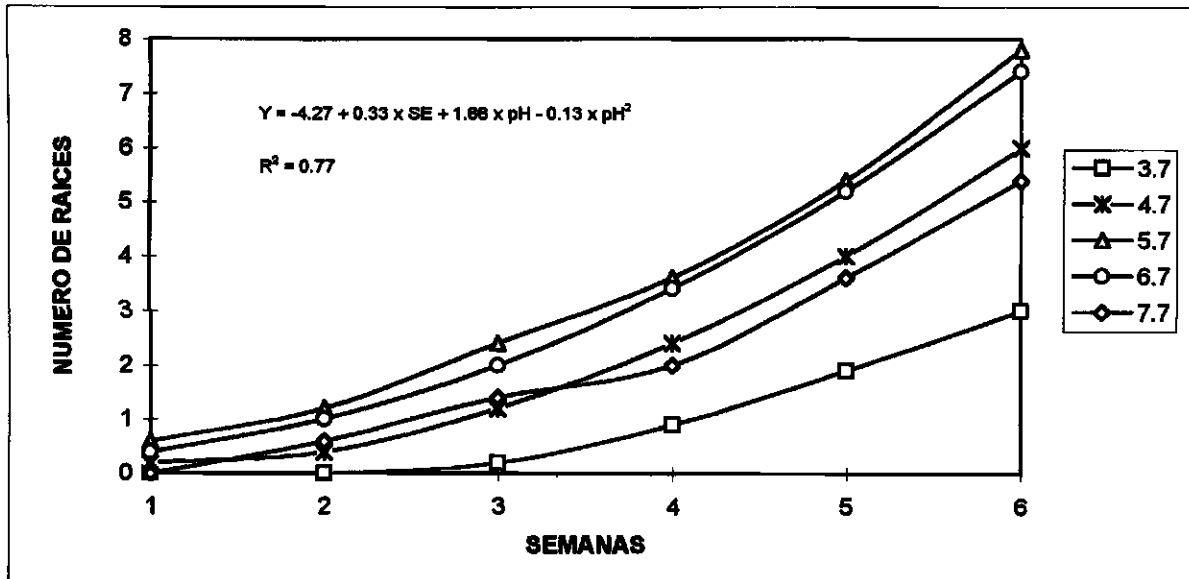


Figura 2. Efecto del pH sobre el incremento en número de raíces por planta de quequisque cultivadas *in vitro* en las semanas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de evaluación.

### 3.1.3-Número de hojas.

Una vez realizado el análisis correspondiente a los datos de la variable número de hojas días después de la inoculación, se observó el mayor número de hojas con el uso del pH 6.7 ; cabe notar que al aumentar o disminuir este nivel de pH el número de hojas se redujo gradualmente (figura 3).

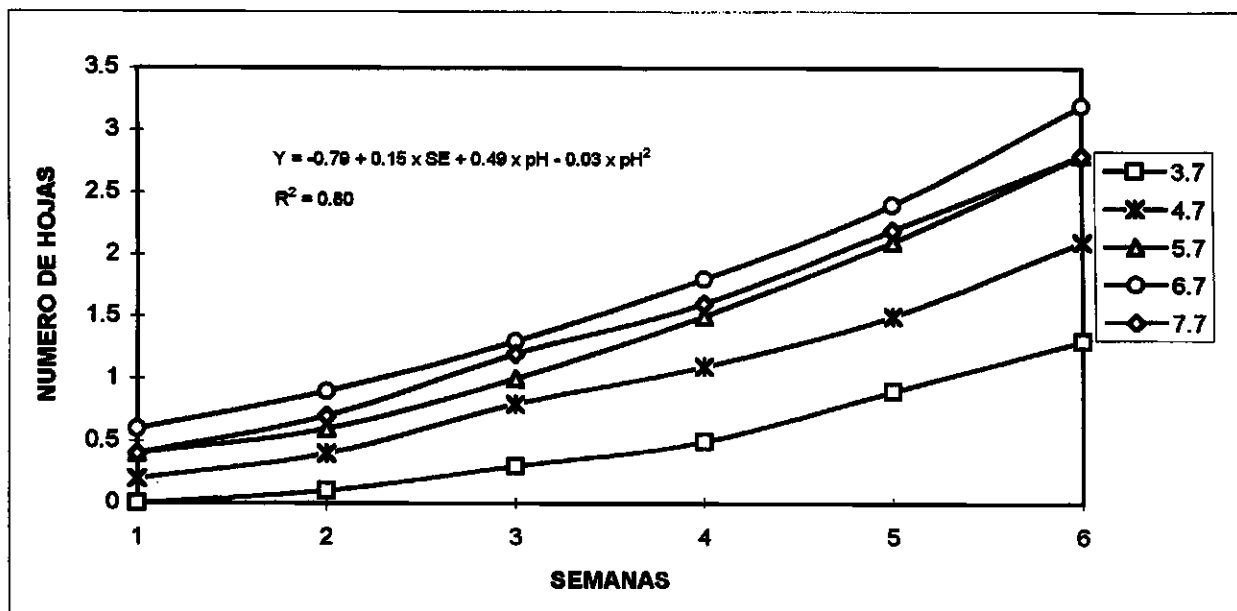


Figura 3. Efecto del pH sobre el incremento en número de hojas por planta de quequisque cultivadas *in vitro* en las semanas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de evaluación.

### 3.1.4-Número de hijos.

Los resultados obtenidos a partir del análisis de regresión a la variable número de hijos determinó que el pH tuvo un efecto cuadrático en interacción con el tiempo.



El número de hijos se fue incrementando semanalmente en dependencia del pH. El mayor número de hijos, cuatro hijos promedio por planta se obtuvo con el uso del pH 6.7 en la sexta semana.

Con el uso de pH mayores o menores a 6.7 el número de hijos promedio fue disminuyendo (figura 4).

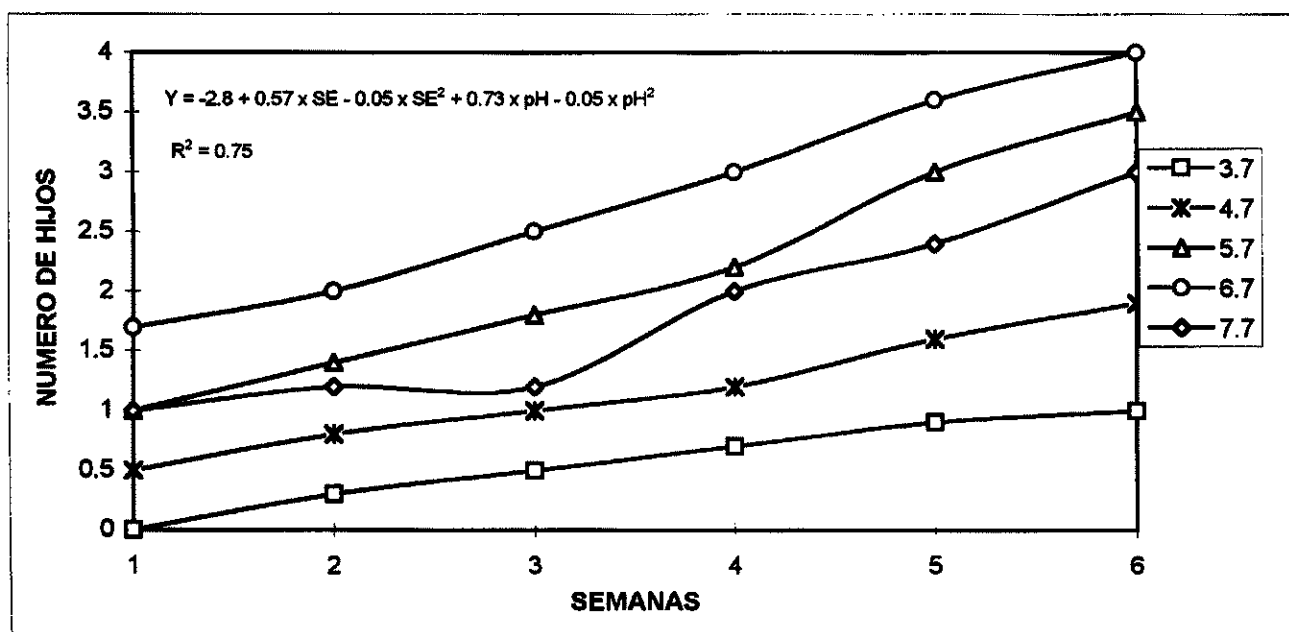


Figura 4. Efecto del pH sobre el incremento en número de hijos por planta de quequisque cultivada *in vitro* en las semanas 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de evaluación.

**3.2- Efecto simple y de interacción de diferentes porcentajes de macro y micronutrientes.**

**3.2.1 Altura de planta.**

Al realizar el ANDEVA a los datos de la variable altura de planta se determinó que no existen diferencias estadísticas significativas entre los diferentes tratamientos obtenidos de las concentraciones de macronutrientes en estudio (50, 90 y 130%). La mayor altura de planta (5.61 cm) se obtuvo en un medio nutritivo con 50% de macronutrientes, las concentraciones de 90% y 130% con 5.14 cm y 3.67 cm respectivamente fueron inferiores. Todos se ubicaron en una misma categoría estadística (tabla 7).

**Tabla 7. Promedios de altura de planta, número de raíces, número de hojas y número de hijos en medios de cultivo a diferentes concentraciones de macro y micronutrientes en estudio.**

Variables	Macronutrientes			Micronutrientes		
	50%	90%	130%	50%	90%	130%
Altura (cm)	5.61a <sup>o</sup>	5.14a	3.67a	5.93a	4.50a	4.17a
N° de raíces	3.00a	2.14ab	0.67b	3.00a	1.56a	1.44a
N° de hojas	3.22a	2.86a	1.22b	2.71a	2.33a	2.22a
N° de hijos	3.33a	1.86a	1.78a	3.43a	2.44a	1.44a

© Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.

El análisis de varianza demostró que no existe diferencias estadísticas significativas entre los porcentajes de

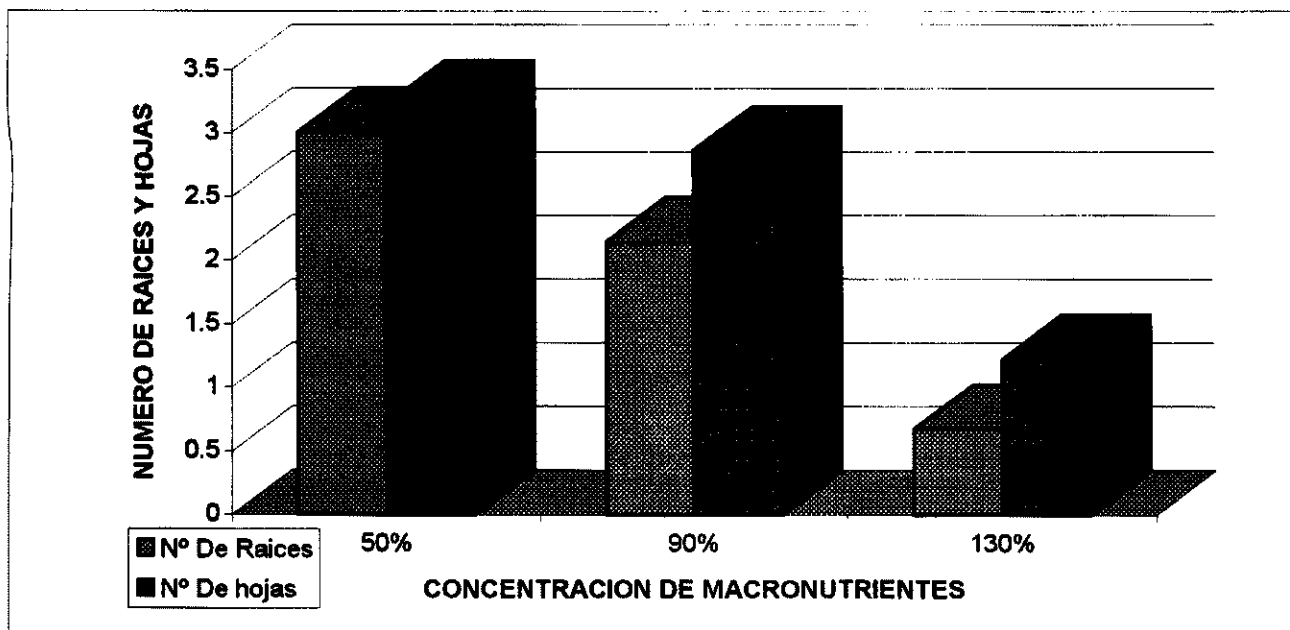
micronutrientes estudiados ni efecto significativo de la interacción entre macro y micronutrientes sobre la variable altura de planta.

En la separación de medias realizada a través de la prueba de DUNCAN se pudo notar que la concentración 50% de micronutrientes indujo a los mejores promedios de altura 5.93 cm, seguido de 4.5 cm con 90 % y 4.17 cm con 130 % respectivamente (tabla 7).

La altura promedio que se logró durante las 6 semanas de estudio, tomando en cuenta todos los tratamientos fue de 4.78 cm.

### **3.2.2-Número de raíces.**

Después de realizado el análisis estadístico se encontró que los macronutrientes tienen efecto significativo sobre la producción de raíces por planta. En la separación de medias realizada a los datos de esta variable se encontró que el 50 % de macronutrientes de las sales del MS indujo a el mayor valor con 3 raíces por planta, diferenciándose significativamente de los valores obtenidos en las concentraciones de 90 y 130 % que fueron de 2.14 y 0.67 raíces promedio por planta respectivamente (tabla 7, figura 5).



**Figura 5. Efecto de diferentes concentraciones de macronutrientes sobre el número de hojas y raíces por planta en cultivo in vitro de quequisque.**

En base a los resultados obtenidos de las concentraciones de micronutrientes del MS estudiados sobre el número de raíces, el ANDEVA realizado no indicó diferencias significativas, tampoco se encontró diferencias significativas entre los tratamientos obtenidos de la combinación de los niveles de macro y micronutrientes estudiados. Sin embargo, el mayor número de raíces se alcanzó con una concentración de 50 % de micronutrientes con un promedio de 3 raíces por planta, seguido de 1.56 y 1.44 raíces inducidas por concentraciones de 90 y 130% respectivamente (tabla 7).

El número promedio general de raíces fue de 1.92 raíces por planta.

### **3.2.3- Número de hojas.**

El análisis realizado a los datos de la variable número de hojas demostró que las concentraciones de macronutrientes sometidos a prueba indujeron a la producción de hojas con diferencias altamente significativas entre los tratamientos.

Al realizar la prueba de rangos múltiples se encontró que con 50 % de macronutrientes se induce a producir un promedio de 3.22 hojas por planta, seguido de la concentración 90% de macronutrientes con 2.86 hojas por planta, ambos en la misma categoría estadística, la concentración de 130% de macronutrientes obtuvo un promedio de 1.22 hojas (tabla 7, figura 5).

En lo que se refiere a los micronutrientes el análisis mostró que los porcentajes estudiados resultaron no tener efecto significativo sobre la variable número de hojas, ubicando todos los niveles en una misma categoría estadística y con un número de hojas de 2.7, 2.3 y 2.2 para los porcentajes de micronutrientes 50 %, 90% y 130 % respectivamente ( tabla 7 ).

No se encontró efecto significativo en la combinación de los niveles de macro y micronutrientes sobre dicha variable. El promedio general de hojas por planta fue de 2.4 hojas.

### **3.2.4- Número de hijos.**

Los resultados del análisis de varianza realizado a los datos de esta variable reflejaron que no existe efecto

significativo entre los tratamientos que presentaron los diferentes niveles de macro y micronutrientes, así como en la interacción. Sin embargo, el mayor número de hijos se observó con 50 % de macronutrientes y 50 % de micronutrientes con un promedio de 3.33 y 3.43 hijos por planta respectivamente (tabla 7).

### **3.3- Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitamina a través del tiempo.**

#### **3.3.1 Altura de planta.**

El análisis de varianza realizado a los datos de la variable altura de planta mostró que las fuentes de variación sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo tuvieron efectos simples significativos. Además la triple interacción sacarosa\*agua de coco\*vitamina resultó tener efecto significativo sobre la altura de planta.

La prueba de rangos múltiples de DUNCAN con un nivel de significancia de 5 % realizada a los datos obtenidos de cada tratamiento demostró que los niveles de sacarosa utilizados se agrupan en dos categorías estadísticas. En la categoría "a" se encontraron las plantas desarrolladas en el medio de cultivo al que se le adicionó 30 g/l de sacarosa con el que se logró la mayor altura de planta, con un promedio de 3.307 cm de altura. En la categoría "b" los medios de cultivo a los cuales se le agregó 45 y 15 g/l de sacarosa obtuvieron un promedio de altura de planta de 2.776 y 2.65 cm de altura respectivamente (tabla 8; figura 6).

Luego de realizar la separación de medias de DUNCAN con 95 % de confianza a los datos obtenidos de las plantas desarrolladas en medios de cultivo a los que se les adicionó agua de coco se encontraron dos categorías estadísticas.

En la categoría "a" se ubicó el tratamiento con 150 ml/l de agua de coco que indujo a una altura de planta promedio de 3.168 cm, siendo éste el mayor promedio en relación a las concentraciones 50 y 100 ml/l de agua de coco que presentaron 2.86 y 2.706 cm de altura respectivamente, ambos en la categoría estadística "b" (tabla 8; figura 6).

Los tratamientos a los cuales se les adicionó vitaminas pueden separarse en dos categorías estadísticas. En primer lugar se ubica el tratamiento con 10 ml/l de vitamina con un promedio de 3.08 cm de altura, seguido por 15 y 5 ml/l de vitamina con promedios de 2.83 y 2.82 cm respectivamente (tabla 8; figura 6).

Los resultados de la prueba de rangos múltiples realizada en los diferentes momentos de evaluación reflejaron 5 categorías estadísticas.

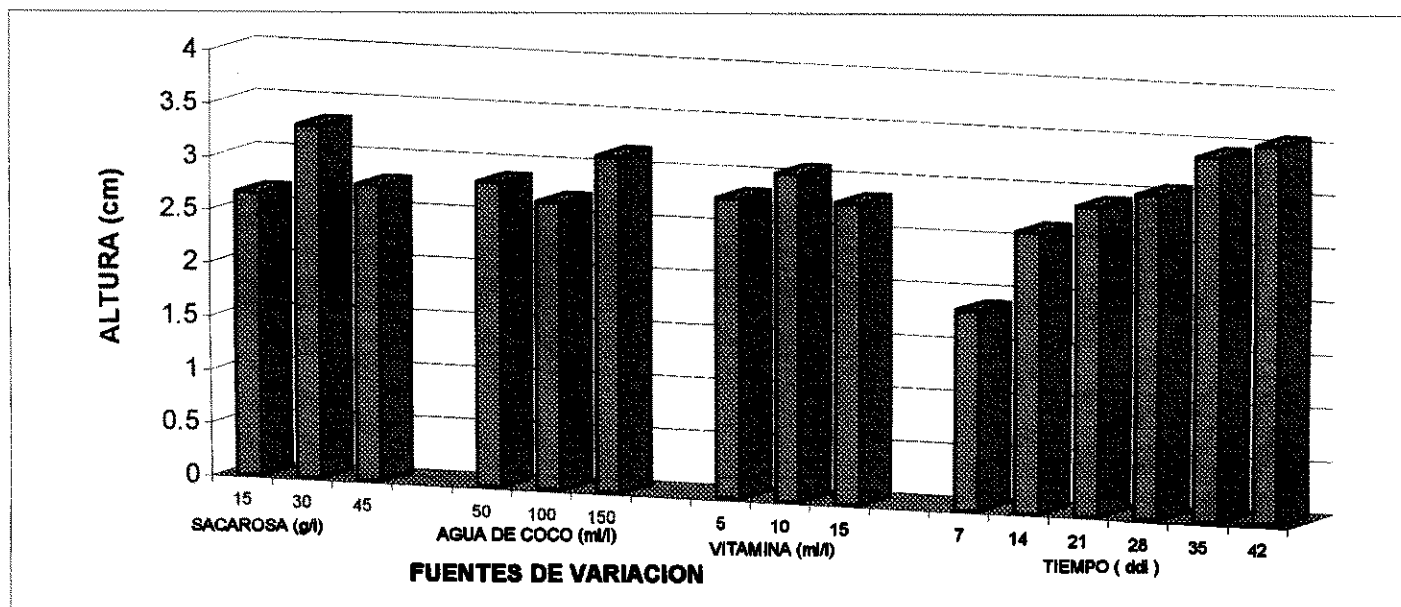
En la primer categoría estadística se ubicaron los niveles 42 y 35 ddi (días después de la inoculación) con promedios de altura de 3.557 cm y 3.428 cm respectivamente. En la segunda y tercer categoría se encontró 28 y 21 ddi con 3.049 cm y 2.909 cm. La altura de planta más baja correspondió al nivel 7ddi ubicado en la última categoría estadística con 1.88 cm (tabla 8; figura 6).



**Tabla 8. Comportamiento de la altura de planta bajo la influencia del efecto simple de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo.**

SAC. (g/l)	ALT. (cm)	A. COCO (ml/l)	ALT. (cm)	VIT. (ml/l)	ALT. (cm)	TIEMPO (días)	ALT. (cm)
15	2.652 b <sup>e</sup>	50	2.860 b	5	2.820 b	7	1.887 d
30	3.307 a	100	2.706 b	10	3.083 a	14	2.640 c
45	2.776 b	150	3.168 a	15	2.883 b	21	2.909 cb
						28	3.049 b
						35	3.428 a
						42	3.557 a

<sup>e</sup> Prueba de DUNCAN, promedios con la misma letra no difieren estadísticamente.



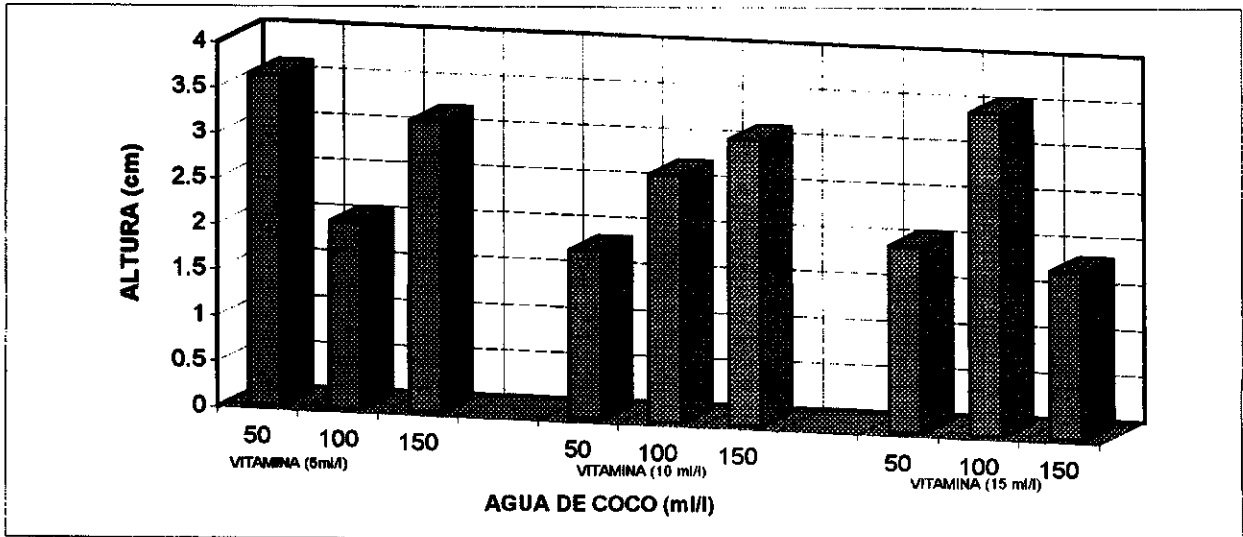
**Figura 6. Altura de planta bajo la influencia del efecto simple de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo.**

La comparación realizada entre los tratamientos producto de la interacción sacarosa\*agua de coco\*vitamina basada en la prueba de rangos múltiples de DUNCAN señalan que comparando el nivel de sacarosa 15 g/l con los diferentes niveles de agua de coco y vitamina produjeron los mejores resultados con el tratamiento aplicado con 15 g/l de sacarosa 50 ml/l de agua de coco y 5 ml/l de vitamina, alcanzando 3.62 cm de altura (tabla 9; figura 7)

**Tabla 9. Altura de planta promedio en los medios de cultivo donde hubo efecto de interacción de sacarosa\*agua de coco\*vitamina.**

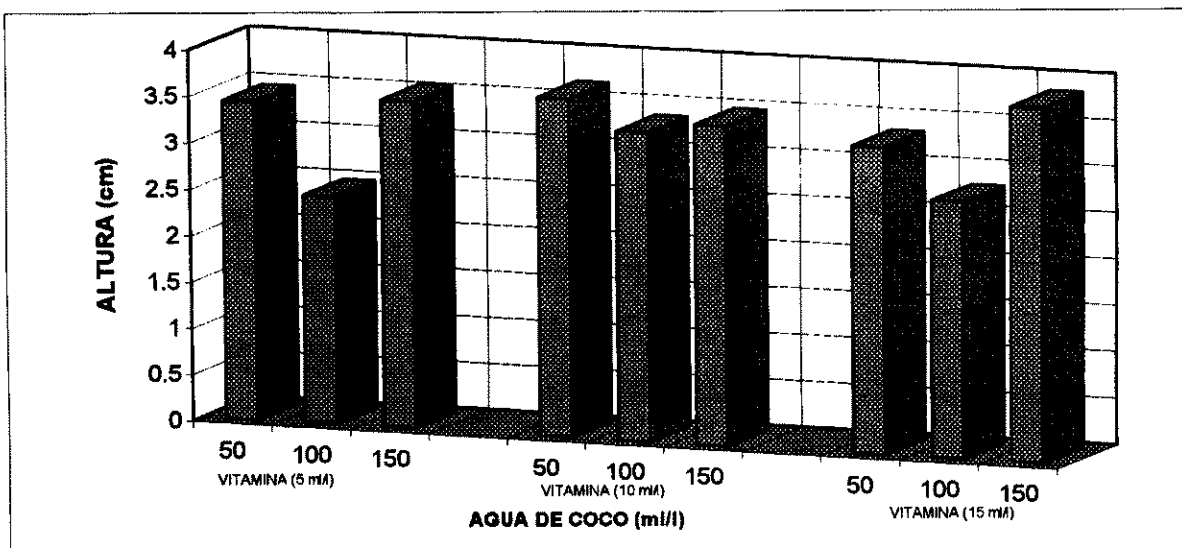
SACAROSA (g/l)	AGUA DE COCO ( ml/l )			VITAMINA (ml/l)
	50	100	150	
15	3.62 a*	2.03 b	3.18 ab	5
15	1.83 c	2.70 ab	3.12 ab	10
15	2.03 b	3.53 ab	1.82 c	15
30	3.43 a	2.45 a	3.53 a	5
30	3.65 a	3.33 a	3.45 a	10
30	3.31 a	2.77 a	3.83 a	15
45	2.63 b	2.18 b	2.32 b	5
45	2.93 ab	2.94 ab	3.90 a	10
45	2.38 b	2.43 b	3.48 ab	15

\* Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.



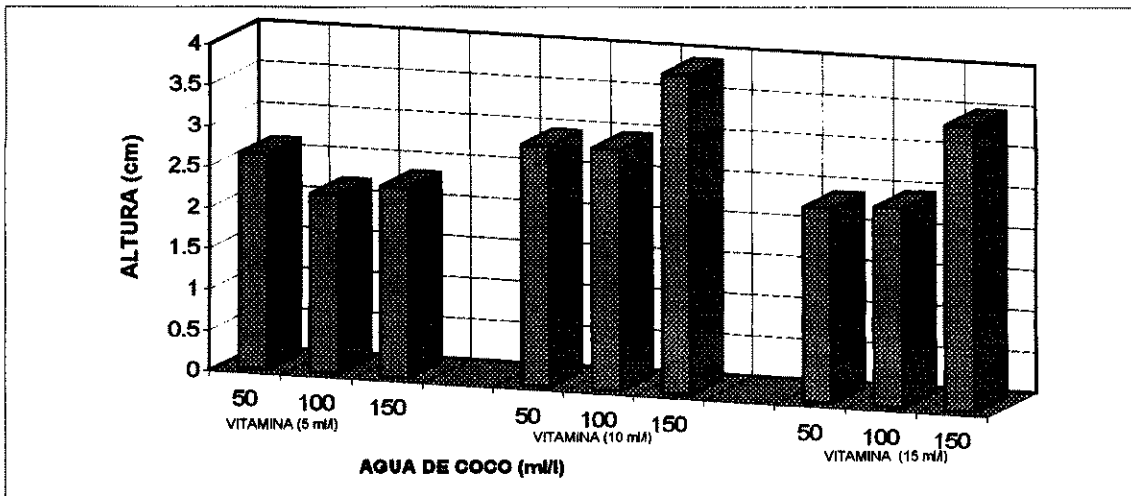
**Figura 7. Altura de planta bajo la influencia de la interacción de 15 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina.**

Comparando el nivel de sacarosa 30 g/l con los diferentes niveles de agua de coco y vitaminas los tratamientos estudiados no difieren estadísticamente, sin embargo, con 30 g/l de sacarosa 150 ml/l de agua de coco y 15 ml/l de vitamina se alcanzó la mayor altura con 3.83 cm (tabla 9; figura 8).



**Figura 8. Altura promedio de planta obtenida en un medio de cultivo bajo la interacción de 30 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina.**

Comparando el nivel de sacarosa 45 g/l con los diferentes niveles de agua de coco y vitaminas el mejor tratamiento fué el aplicado con 45 g/l de sacarosa 150 ml/l de agua de coco y 10 ml/l de vitamina en el cual alcanzó una altura de 3.90 cm (tabla 9; figura 9).



**Figura 9. Altura promedio de planta obtenida en los medios de cultivo bajo la influencia de la interacción de 45 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina.**

Haciendo una comparación entre los tres niveles de sacarosa con respecto a los diferentes niveles de agua de coco y vitaminas la mayor altura se logró con 45 g/l de sacarosa 150 ml/l de agua de coco y 10 ml/l de vitamina (tabla 9).

### **3.3.2-Número de raíces.**

El análisis de varianza realizado a la variable número de raíces demuestra con un 95 % de confianza que hubo diferencias significativas al adicionar los diferentes niveles de sacarosa, agua de coco y tiempo, además existe efecto que marca diferencias significativas en las interacciones dobles y triples sacarosa\*agua de coco, sacarosa\*agua de coco\*vitamina, sacarosa\*tiempo, agua de coco\*tiempo, sacarosa\*agua de coco\*tiempo.

Al hacer la separación de medias de los tratamientos, a la variable número de raíces el nivel de sacarosa 45 g/l presentó el mayor valor promedio de 2.39 raíces, diferenciándose significativamente de los obtenidos con 30 g/l y 15 g/l con 1.71 y 0.84 raíces promedio respectivamente (tabla 10; figura 10).

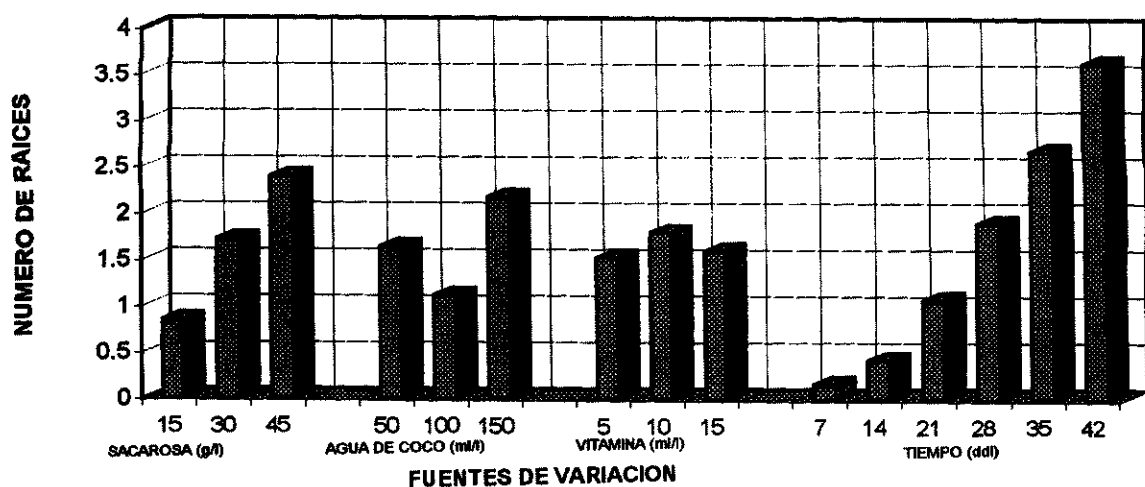
**Tabla 10. Número de raíces promedio por planta obtenidos en los medios de cultivo bajo el efecto simple de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo.**

Sac. (g/l)	# de Raiz	A.coco (m/l)	# de Raiz	Vit. (m/l)	# de Raiz	Tiempo (ddi)	# de Raiz
15	0.84 c*	50	1.63 b	5	1.52 a	7	0.16 e
30	1.71 b	100	1.11 c	10	1.79 a	14	0.42 e
45	2.39 a	150	2.17 a	15	1.59 a	21	1.07 d
						28	1.89 c
						35	2.67 b
						42	3.62 a

\* Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.

Con respecto a los niveles de agua de coco encontramos el nivel 150 ml/l con 2.166 raíces promedio diferenciándose del nivel 50 ml/l con 1.633 raíces, seguido de 100 ml/l con 1.11 raíces (tabla 10; figura 10).

El mayor número de raíces se obtuvo a los 42 ddi (días después de la inoculación) con un promedio de 3.621 raíces diferenciándose significativamente del resto de niveles (tabla 10; figura 10).



**Figura 10. Efecto simple de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo, sobre el número promedio de raíces por planta.**

La prueba de rangos múltiples para la interacción sacarosa\*agua de coco mostró que la combinación de 45 g/l de sacarosa con 150 ml/l de agua de coco indujo a la producción del mayor promedio con 3.79 raíces, diferenciándose significativamente del resto de combinaciones, el promedio más bajo se obtuvo con la interacción de 15 g/l de sacarosa con 100 ml/l de agua de coco, desarrollando un promedio de 0.66 raíces por planta (tabla 11; figura 11).

Tabla 11. Número de raíces promedio en el medio de cultivo bajo la interacción sacarosa\*agua de coco.

SACAROSA ( g/l )	AGUA DE COCO ( ml/l )		
	50	100	150
15	0.55 b*	0.66 b	1.30 ab
30	2.52 ab	1.16 ab	1.50 ab
45	1.88 ab	1.55 ab	3.79 a

\*Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.

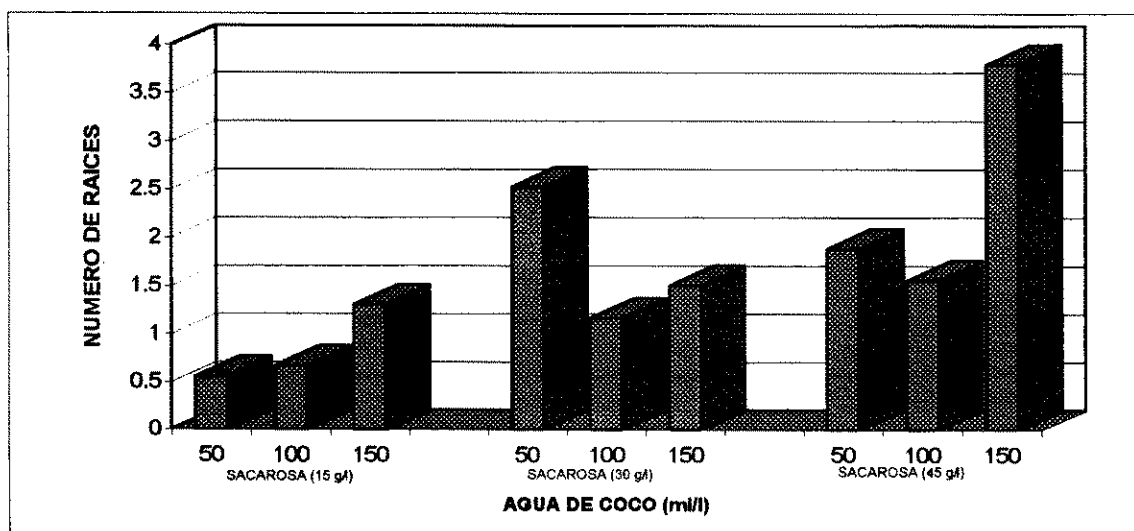


Figura 11. Número promedio de raíces por planta obtenidas en los medios de cultivo bajo la interacción sacarosa\* agua de coco.

Al hacer la separación de medias de los tratamientos producto de la interacción sacarosa\*agua de coco\*vitamina, resultó que 15 g/l de sacarosa con los diferentes niveles de agua de coco y vitamina no difieren estadísticamente y se obtuvieron números de raíces bajos que van de cero raíces en

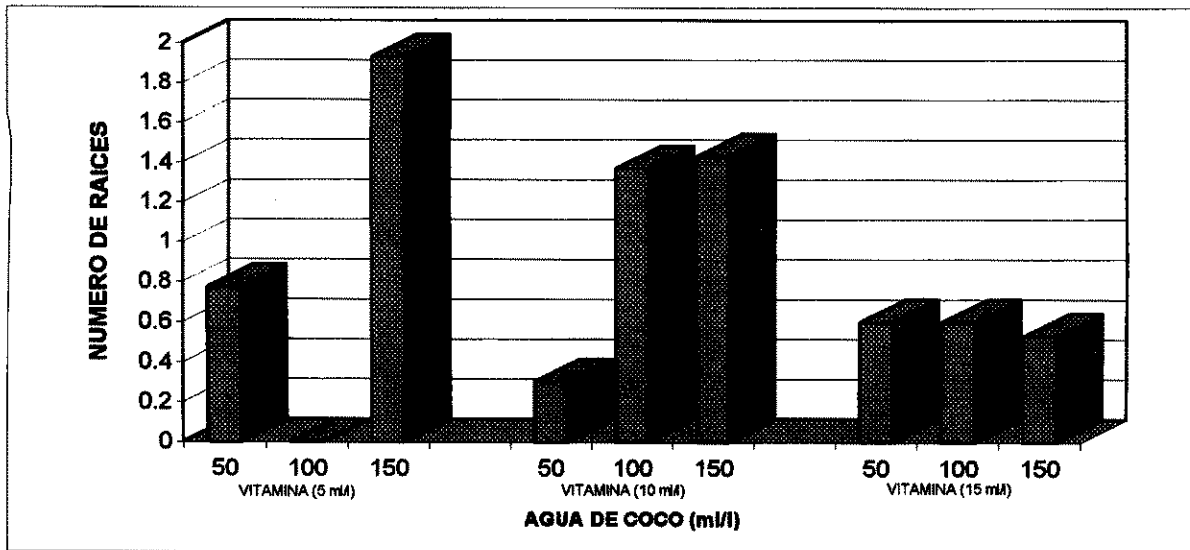


medios de cultivos con 15 g/l de sacarosa y 50 ml/l de agua de coco, hasta 1.93 raíces con 15 g/l de sacarosa y 150 ml/l de agua de coco (tabla 12; figura 12).

**Tabla 12. Número de raíces promedio por planta obtenidas en un medio de cultivo bajo la interacción sacarosa\*agua de coco\*vitamina.**

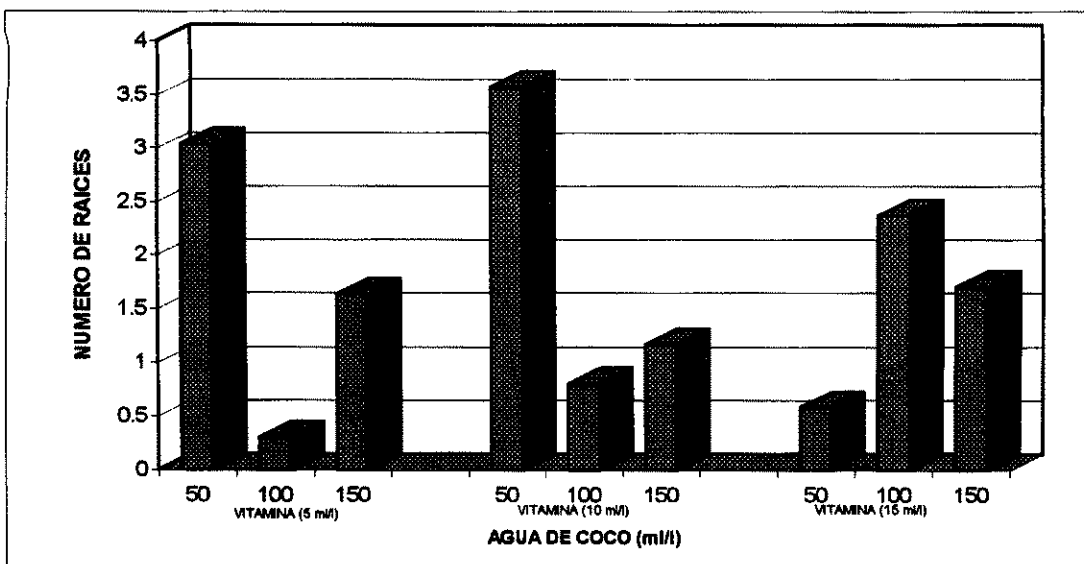
SACAROSA (g/l)	AGUA DE COCO (ml/l)			VITAMINA (ml/l)
	50	100	150	
15	0.77 a*	0 a	1.93 a	5
15	0.30 a	1.37 a	1.43 a	10
15	0.60 a	0.60 a	0.53 a	15
30	3.03 ab	0.30 b	1.63 ab	5
30	3.57 a	0.80 b	1.17 ab	10
30	0.58 b	2.37 ab	1.70 ab	15
45	1.50 b	1.33 b	3.23 ab	5
45	2.73 ab	2.21 b	2.84 ab	10
45	1.40 b	1.23 b	5.13 a	15

\*Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.



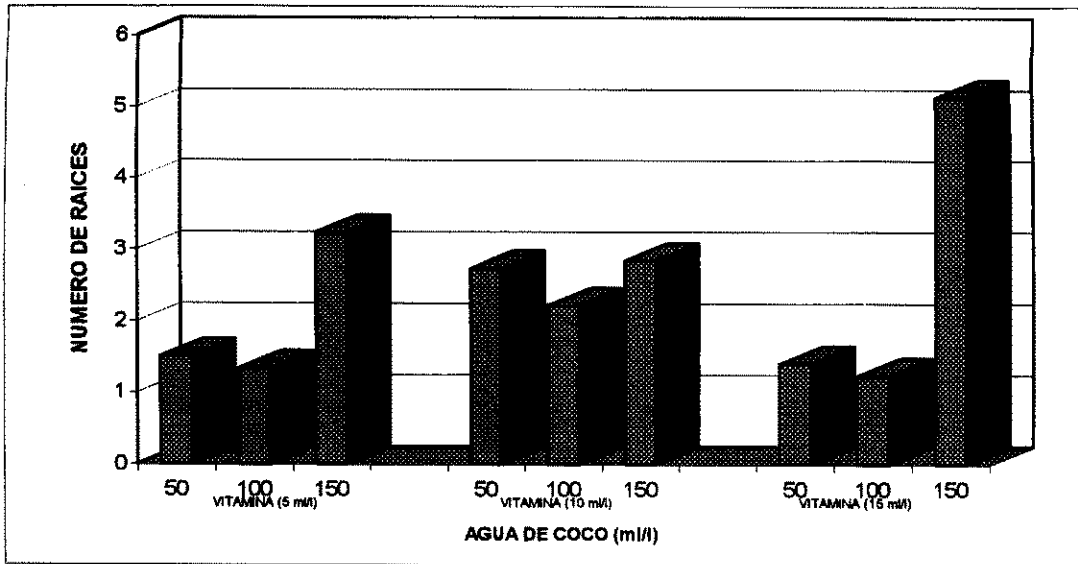
**Figura 12. Efecto de la interacción de 15 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina sobre la variable número de raíces.**

Comparando el nivel de sacarosa 30 g/l con los diferentes niveles de agua de coco y vitamina, el tratamiento 30 g/l de sacarosa, 50 ml/l de agua de coco y 10 ml/l de vitamina se ubicó en la primer categoría estadística con un promedio de 3.57 raíces por planta, diferenciándose significativamente de los otros tratamientos. El número de raíces más bajo fue 0.3 con 30 g/l de sacarosa, 100 ml/l de agua de coco y 5 ml/l de vitamina (tabla 12; figura 13).



**Figura 13. Efecto de la interacción de 30 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina sobre la variable número de raíces.**

Al hacer la comparación entre el nivel de sacarosa 45 g/l con los diferentes niveles de agua de coco y vitamina el tratamiento 45 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco y 15 ml/l de vitamina produjo el mejor resultado con un promedio de 5.13 raíces por planta, ubicándose en la primer categoría estadística y diferenciándose significativamente de los otros tratamientos (tabla 12; figura 14).



**Figura 14. Efecto de la interacción de 45 g/l de sacarosa con diferentes concentraciones de agua de coco y vitamina sobre la variable número promedio de raíces por planta.**

De los tres niveles de sacarosa estudiados el que indujo los mayores resultados fue 45 g/l en interacción con 150 ml/l de agua de coco y 15 ml/l de vitamina siendo éste de 5.13 raíces por planta (tabla 12).

La separación de medias de la interacción sacarosa\*tiempo nos muestra que la combinación 45 g/l de sacarosa a los 42 ddi indujo los mejores resultados con 5.86 raíces promedio por planta, comparado con los demás tratamientos. En cada uno de los niveles de sacarosa en estudio el número de raíces aumentó proporcionalmente con el tiempo (tabla 13; figura 15).

Tabla 13. Comportamiento de la variable número de raíces bajo la interacción sacarosa\*tiempo.

SACAROSA ( g/l )	TIEMPO (días después de la inoculación)					
	7	14	21	28	35	42
15	0.13 d*	0.35 d	0.82 d	1.11 d	1.24 d	1.3bcd
30	0.04 d	0.52 d	1.25 d	2.02bcd	2.6bcd	3.7abc
45	0.29 d	0.37 d	1.14 d	2.58bcd	4.19ab	5.86 a

\* Prueba de DUNCAN: promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.

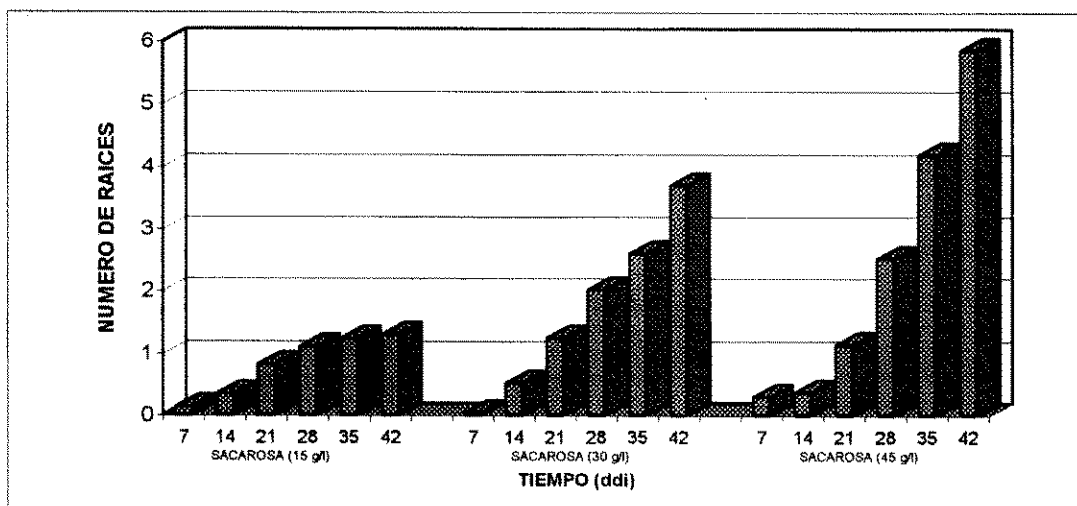


Figura 15. Número promedio de raíces por planta bajo la interacción sacarosa\*tiempo.

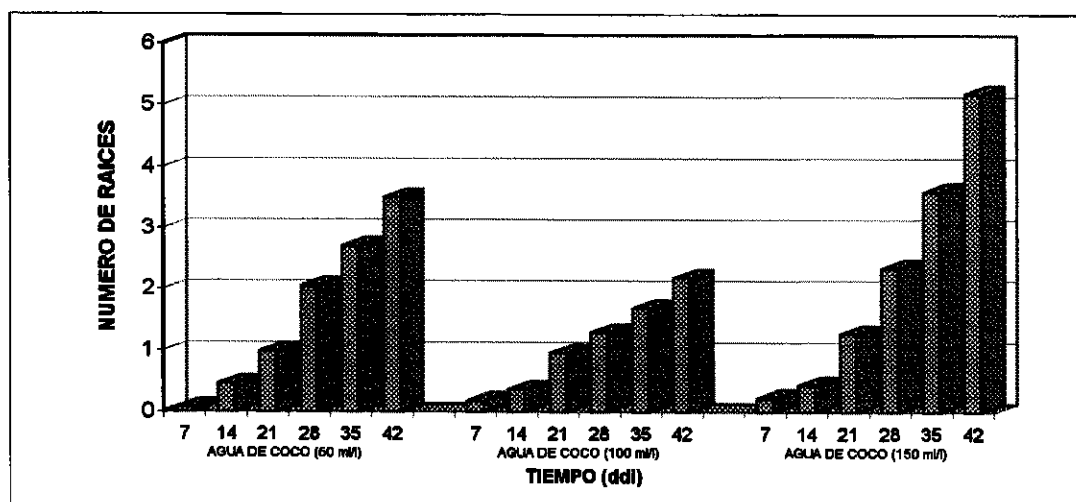
En la interacción agua de coco\*tiempo el tratamiento 150 ml/l de agua de coco a los 42 ddi mostró el mejor resultado con 5.18 raíces seguido por el tratamiento 150 ml/l de agua de coco a los 35 ddi con 3.59 raíces. En cada nivel de agua de coco estudiado el mayor número de raíces se obtuvo a los 42 ddi

disminuyendo gradualmente a medida se reduce el tiempo (tabla 14; figura 16).

**Tabla 14. Comportamiento de la variable número de raíces bajo la interacción agua de coco\*tiempo.**

AGUA DE COCO (ml/l)	TIEMPO ( Días Después de la Inoculación )					
	7	14	21	28	35	42
50	0.07 c*	0.45 c	0.98bc	2.05bc	2.7abc	3.5ab
100	0.18 c	0.36 c	0.95bc	1.29bc	1.68bc	2.18bc
150	0.22 c	0.43 c	1.27bc	2.34bc	3.59ab	5.18 a

\* Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.



**Figura 16. Número de raíces bajo la interacción agua de coco\*tiempo.**

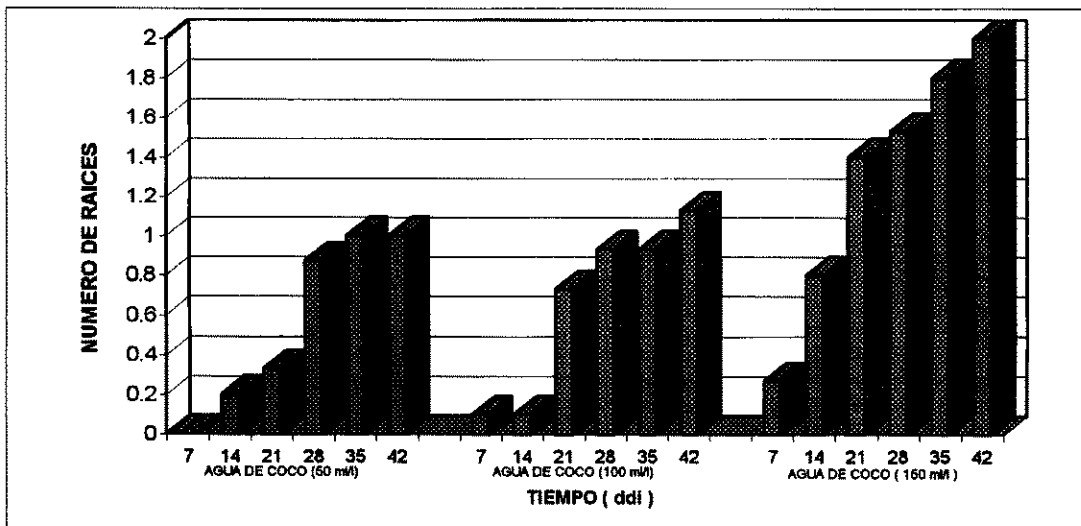
Al realizar la separación de medias de tratamientos a la interacción sacarosa\*agua de coco\*tiempo se observó que al comparar el nivel de sacarosa 15 g/l con los diferentes niveles de agua de coco días después de la inoculación, no se encontró

diferencia estadísticamente significativa entre las medias de dichos tratamientos; sin embargo, el tratamiento 15 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco a los 42 ddi presentó el mayor promedio con 2 raíces promedio por planta (tabla 15; figura 17).

Tabla 15. Número promedio de raíces por planta en los medios de cultivo bajo la interacción sacarosa\*agua de coco\*tiempo.

SACAROSA ( g/l )	AGUA DE COCO ( ml/l )			Tiempo (ddi)
	50	100	150	
15	0.0 a <sup>e</sup>	0.10 a	0.27 a	7
15	0.2 a	0.10 a	0.80 a	14
15	0.33 a	0.73 a	1.40 a	21
15	0.87 a	0.93 a	1.53 a	28
15	1.0 a	0.93 a	1.8 a	35
15	1.0 a	1.13 a	2.00 a	42
30	0.14 d	0.0 d	0.0 d	7
30	0.93 c	0.33 d	0.33 d	14
30	1.78 bc	1.06 c	0.93 c	21
30	3.14 abc	1.26 bc	1.73 bc	28
30	4.14 ab	1.73 bc	2.20 bc	35
30	5.0 a	2.53 abc	3.80 abc	42
45	0.07 e	0.43 e	0.20 e	7
45	0.27 e	0.71 e	0.20 e	14
45	0.87 e	1.07 de	1.50 de	21
45	2.20 cde	1.71 cde	3.86 cd	28
45	3.20 cde	2.43 cde	7.0 b	35
45	4.67 bc	2.93 cde	10.1 a	42

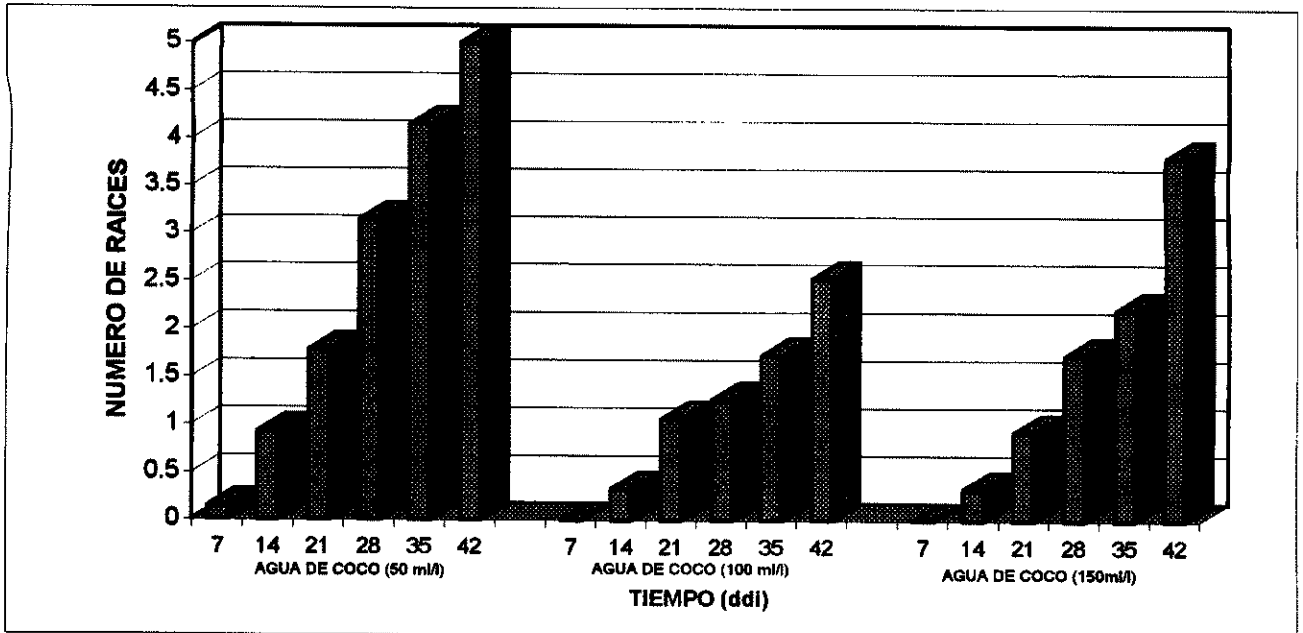
@ Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.



**Figura 17. Número promedio de raíces por planta en los medios de cultivo bajo la interacción de 15 g/l de sacarosa con tres niveles de agua de coco días después de la inoculación.**

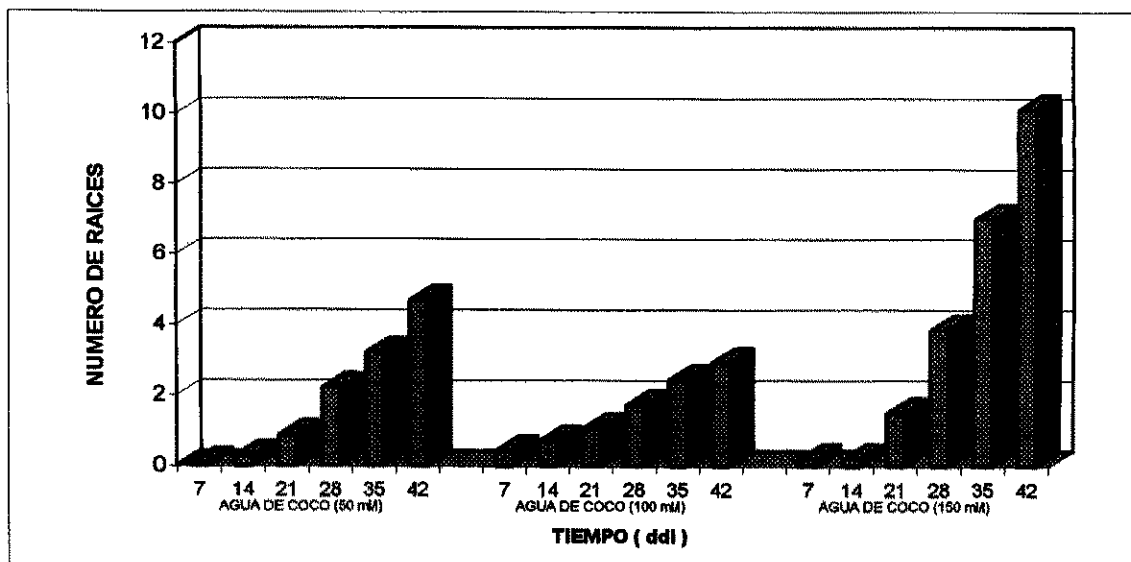
Comparando el nivel de sacarosa 30 g/l con los diferentes niveles de agua de coco y tiempo encontramos en la primer categoría estadística al tratamiento 30 g/l de sacarosa, 50 ml/l de agua de coco a los 42 ddi con 5 raíces seguido de el tratamiento 30 g/l de sacarosa, 50 ml/l de agua de coco a los 35 ddi con 4.14 raíces promedio por planta, diferenciándose significativamente de los otros tratamientos. En éste caso los tratamientos 30 g/l de sacarosa, 100 ml/l de agua de coco a los 7 ddi y 30 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco a los 7 ddi presentaron el valor más bajo con cero raíces promedio por planta (tabla 15; figura 18).





**Figura 18. Número de raíces promedio por planta en medios de cultivo bajo la interacción de 30 g/l de sacarosa con tres niveles de agua de coco días después de la inoculación.**

Comparando el nivel de sacarosa 45 g/l con los diferentes niveles de agua de coco y tiempo observamos que en las dos primeras categorías estadísticas tenemos a los tratamientos 45 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco a los 42 ddi y 45 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco a los 35 ddi con 10.07 y 7 raíces promedio por planta respectivamente, diferenciándose significativamente del resto de tratamientos; el promedio más bajo fue del tratamiento 45 g/l de sacarosa, 50 ml/l de agua de coco a los 7 ddi con 0.07 raíces por planta (tabla 15; figura 19).



**Figura 19. Número de raíces promedio por planta en medios de cultivos bajo la interacción de 45 g/l de sacarosa con tres niveles de agua de coco días después de la inoculación.**

### 3.3.3- Número de hojas.

El análisis de varianza realizado a los datos de la variable número de hojas determinó que existen diferencias significativas entre los tratamientos sometidos a los diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, tiempo y en las dobles interacciones sacarosa\*vitamina y sacarosa\*tiempo.

La prueba de rangos múltiples de DUNCAN realizada con un nivel de significancia del 5 % a la variable número de hojas indica que con 15 g/l de sacarosa se alcanzaron 2.22 hojas promedio por planta siendo éste el mayor valor comparado con 30 y 45 g/l que presentaron 1.86 y 1.67 hojas promedio por planta respectivamente (tabla 16; figura 20).

Tabla 16. Número promedio de hojas por planta en el medio de cultivo MS bajo el efecto simple de diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitamina días después de la inoculación.

Sac. (g/l)	# de hojas	A.coco (ml/l)	# de hojas	Vit. (ml/l)	# de hojas	Tiempo (dd)	# de hojas
15	2.22 a*	50	2.03a	5	1.90 a	7	0.48 f
30	1.86 b	100	1.92ab	10	1.96 a	14	1.44 e
45	1.67 c	150	1.81 b	15	1.90 a	21	1.79 d
						28	2.31 c
						35	2.61 b
						42	2.89 a

\* Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.

En el caso de los diferente niveles de agua de coco, 50 ml/l se ubica en la primer categoría estadística con 2.03 hojas promedio por planta seguido de 100 y 150 ml/l con 1.92 y 1.81 hojas promedio por planta respectivamente (tabla 16; figura 20).

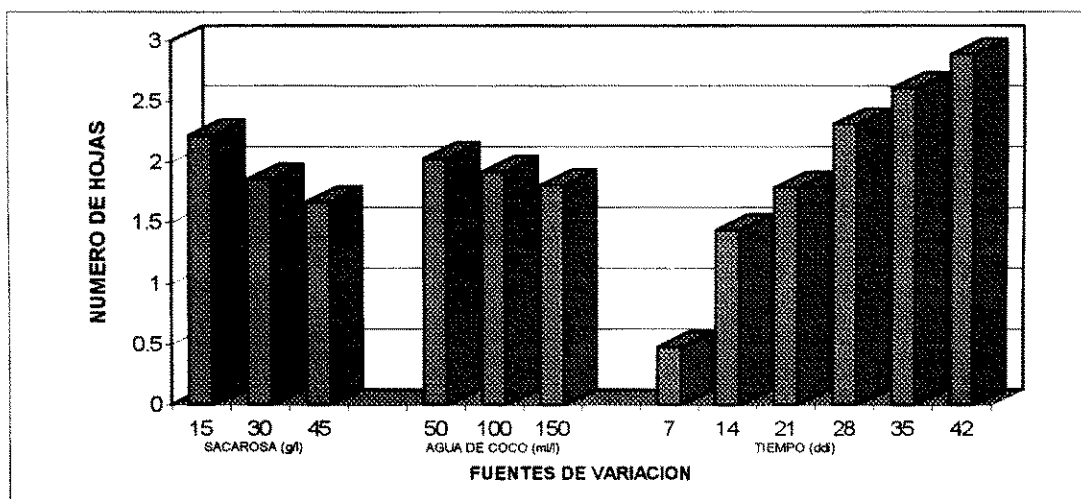


Figura 20. Efecto simple de tres niveles de sacarosa, agua de coco y tiempo sobre el número de hojas.

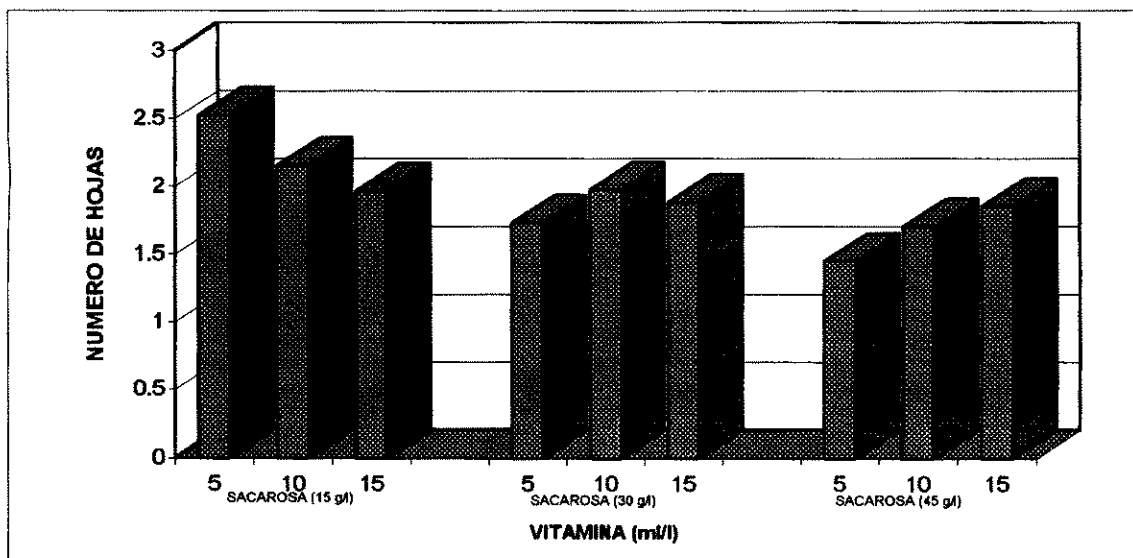
Con respecto al tiempo, 42 ddi con 2.89 hojas se encuentra en la primer categoría estadística, disminuyendo el número de hojas directamente proporcional al tiempo hasta llegar a 0.48 hojas en 7 ddi (tabla 16; figura 20).

Los resultados en la comparación de medias de la interacción sacarosa\*vitamina indican que el tratamiento 15 g/l de sacarosa, 5 ml/l de vitamina se ubicó en la primer categoría estadística con 2.52 hojas promedio por planta, seguido por 15 g/l de sacarosa, 10 ml/l de vitamina con 2.15 hojas promedio por planta en la segunda categoría estadística; el promedio de hojas más bajo fue 1.45 con el tratamiento 45 g/l de sacarosa, 5 ml/l de vitamina (tabla 17; figura 21).

**Tabla 17. Comportamiento del número de hojas promedio por planta en un medio de cultivo bajo el efecto de la interacción sacarosa\*vitamina.**

SACAROSA (g/l)	VITAMINA ( ml/l )		
	5	10	15
15	2.52 a <sup>o</sup>	2.15 ab	1.96 ab
30	1.73 ab	1.97 ab	1.88 ab
45	1.45 b	1.70 ab	1.85 ab

@Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.



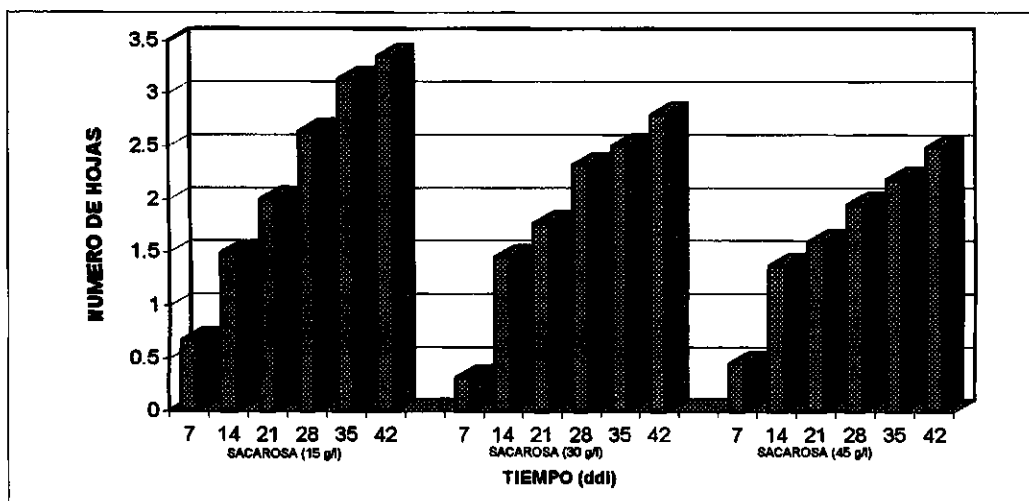
**Figura 21. Número promedio de hojas por planta en un medio de cultivo bajo la interacción sacarosa\*vitamina.**

En la comparación de medias realizada a la interacción sacarosa\*tiempo el mayor valor lo alcanzó el tratamiento 15 g/l de sacarosa a los 42 ddi con 3.35 hojas seguido por 15 g/l de sacarosa a los 35 ddi con 3.13 hojas por planta. El promedio más bajo fue 0.32 hojas con 30 g/l de sacarosa a los 7 ddi (tabla 18; figura 22).

**Tabla 18. Número de hojas promedio por planta bajo el efecto de la interacción sacarosa\*tiempo.**

SACAROSA ( g/l )	TIEMPO (días después de la inoculación)					
	7	14	21	28	35	42
15	0.67 c*	1.49c	2.0 bc	2.64bc	3.13ab	3.35a
30	0.32 c	1.45c	1.77 c	2.32bc	2.50bc	2.8abc
45	0.45 c	1.37c	1.60 c	1.95 c	2.19bc	2.49bc

\* Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.



**Figura. 22 Número de hojas promedio por planta bajo la interacción sacarosa\*tiempo.**

#### **2.3.4- Número de hijos.**

El análisis de varianza realizado a los datos de la variable número de hijos mostró que existen diferencias significativas en los diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y el tiempo así como en las dobles interacciones sacarosa\*agua de coco y en la triple interacción sacarosa\*agua de coco\*vitamina.

La prueba de rangos múltiples de DUNCAN refleja que 30 g/l de sacarosa presentó los mejores resultados con 3.56 hijos, seguido por 45 y 15 g/l con 2.78 y 2.15 hijos respectivamente (tabla 19; figura 23).

El nivel de agua de coco que mejor resultado indujo fue 150 ml/l con 3.32 hijos promedio por planta seguido de 100 y 50 ml/l con 2.62 y 2.55 hijos por planta respectivamente (tabla 19; figura 23)

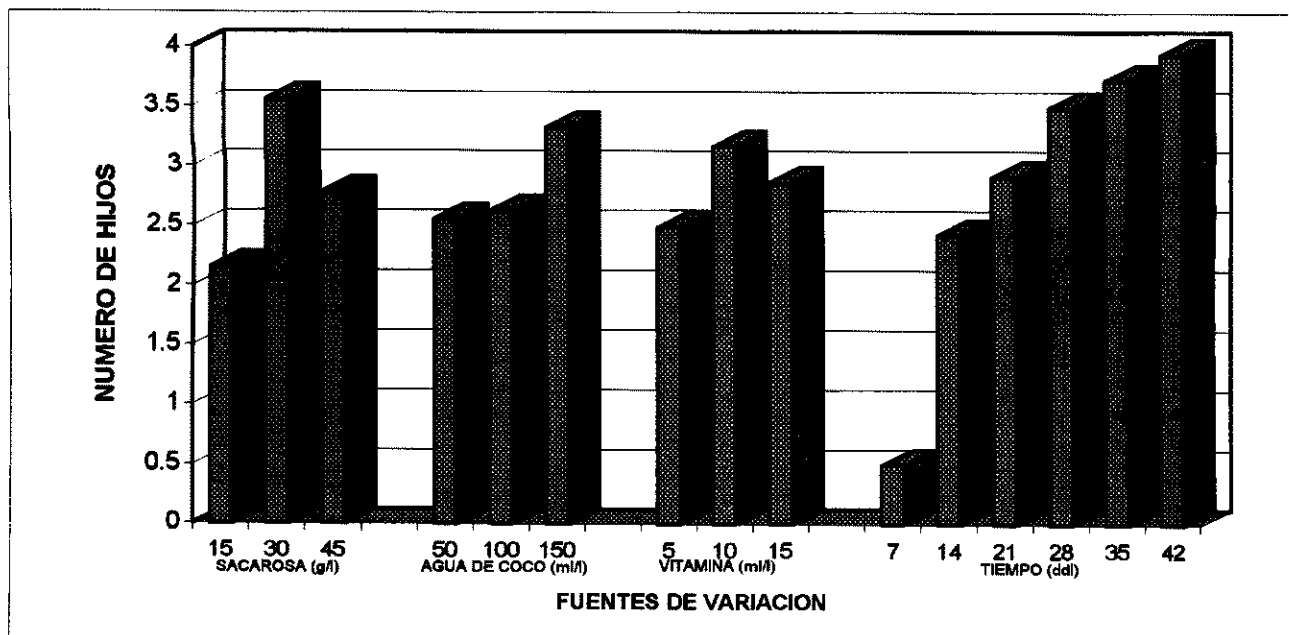
Tabla. 19 Número promedio de hijos por planta desarrolladas en un medio de cultivo bajo el efecto simple de diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo.

Sac. (g/l)	# de hijos	A.coco (ml/l)	# de hijos	Vit. (ml/l)	# de hijos	Tiempo (ddi)	# de hijos
15	2.15 c <sup>e</sup>	50	2.55 b	5	2.48 b	7	0.50 c
30	3.56 a	100	2.62 b	10	3.16 a	14	2.42 b
45	2.78 b	150	3.32 a	15	2.86 a	21	2.91 b
						28	3.49 a
						35	3.72 a
						42	3.94 a

© Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.

Por otra parte los niveles de vitamina 10 y 15 ml/l se ubicaron en la primer categoría estadística con 3.16 y 2.86 hijos por planta seguidos por 5 ml/l con 2.48 hijos (tabla 19; figura 23).

En el análisis realizado días después de la inoculación, se ubican en la categoría estadística "a" 42, 35 y 28 ddi con 3.94, 3.72 y 3.4 hijos promedios por planta respectivamente, seguidos por 21 y 14 ddi con 2.91 y 2.40 hijos; finalmente 7 ddi presentó 0.5 hijos (tabla 19; figura 23).



**Figura 23. Efecto simple de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco, vitamina y tiempo sobre el número promedio de hijos por planta.**

De acuerdo a la comparación de medias de DUNCAN realizada a los datos de la variable número de hijos en la interacción sacarosa\*agua de coco se ubicaron en primer lugar los tratamientos 30 g/l de sacarosa, 50 ml/l de agua de coco y 45 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco superando estadísticamente a las demás combinaciones con 4.17 y 3.69 hijos respectivamente. La categoría estadística más baja le corresponde al tratamiento 15 g/l de sacarosa, 100 ml/l de agua de coco con un promedio de 0.85 hijos por planta (tabla 20; figura 24).



Tabla 20. Número promedio de hijos por planta obtenidas en un medio MS bajo la interacción de diferentes niveles de sacarosa\*agua de coco.

SACAROSA (g/l)	AGUA DE COCO ( ml/l )		
	50	100	150
15	0.85 b*	2.79 ab	2.80 ab
30	4.17 a	3.08 ab	3.48 ab
45	2.72 ab	1.94 ab	3.69 a

\* Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.

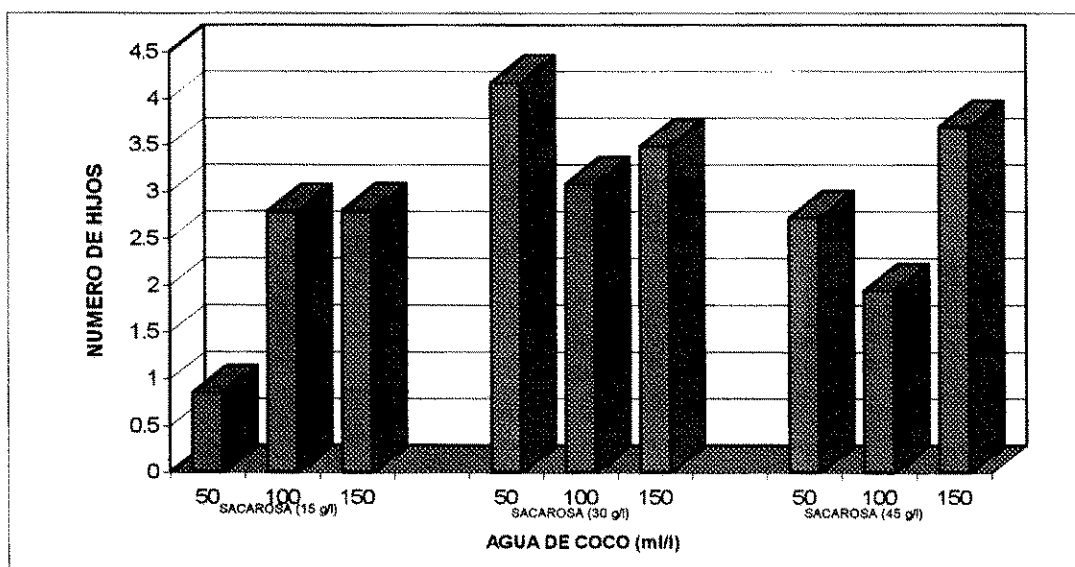


Figura 24. Número promedio de hijos por planta bajo la interacción sacarosa\*agua de coco.

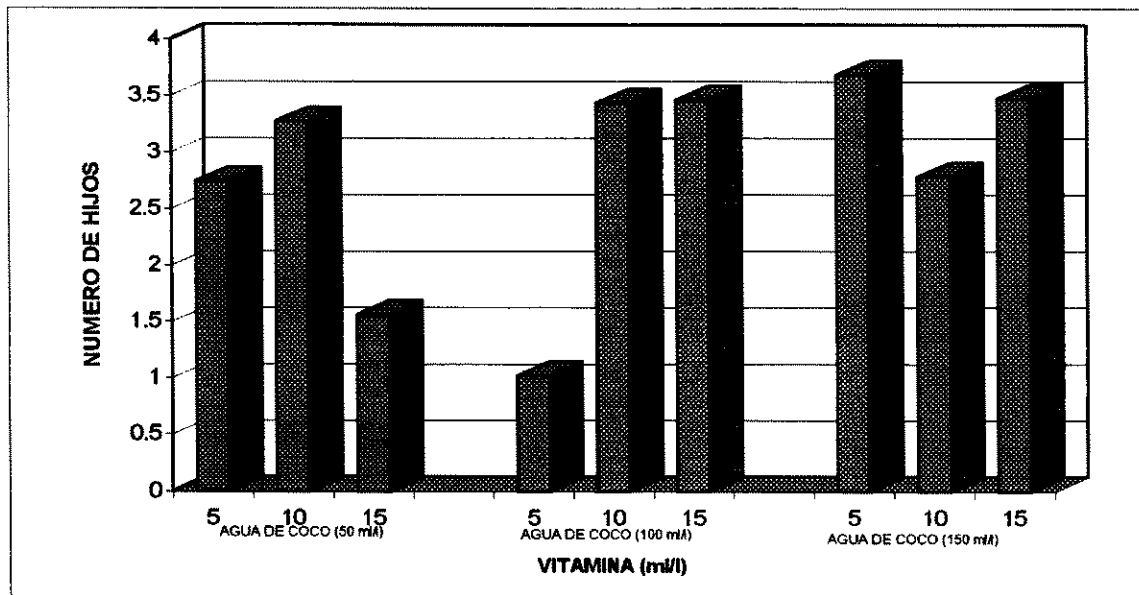
La separación de medias de la interacción agua de coco\*vitamina proporcionó tres categorías estadísticas diferentes. En la primer categoría estadística se ubicó el tratamiento 150 ml/l de agua de coco, 5 ml/l de vitamina con 3.68 hijos por planta. El promedio más bajo fue del tratamiento 100 ml/l de agua de coco, 5 ml/l de vitamina con 1.02 hijos (tabla

21; figura 25).

**Tabla 21. Número promedio de hijos por planta bajo la interacción agua de coco\*vitamina.**

AGUA DE COCO ( ml/l )	VITAMINA ( ml/l )		
	5	10	15
50	2.74 ab*	3.27 ab	1.56 ab
100	1.02 b	3.43 ab	3.46 ab
150	3.68 a	2.78 ab	3.47 ab

\* Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.



**Figura 25. Número promedio de hijos por planta bajo la interacción agua de coco\*vitamina.**

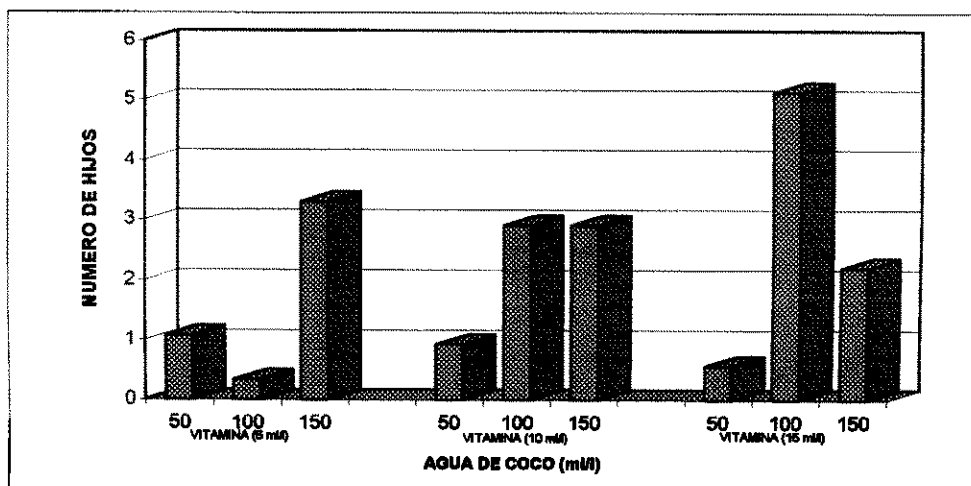
Separando las medias del conjunto de tratamientos resultantes de la interacción sacarosa\*agua de coco\*vitamina se observó que al comparar el nivel de sacarosa 15 g/l con los diferentes niveles de agua de coco y vitamina el tratamiento 15 g/l de sacarosa, 100 ml/l de agua de coco y 15 ml/l de vitamina

se ubicó en la primer categoría estadística con 5.13 hijos seguido por el tratamiento 15 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco y 5 ml/l de vitamina con 3.3 hijos. El promedio más bajo fue del tratamiento 15 g/l de sacarosa, 100 ml/l de agua de coco y 5 ml/l de vitamina con 0.33 hijos (tabla 22; figura 26).

**Tabla 22. Número promedio de hijos por planta bajo la interacción sacarosa\*agua de coco\*vitamina.**

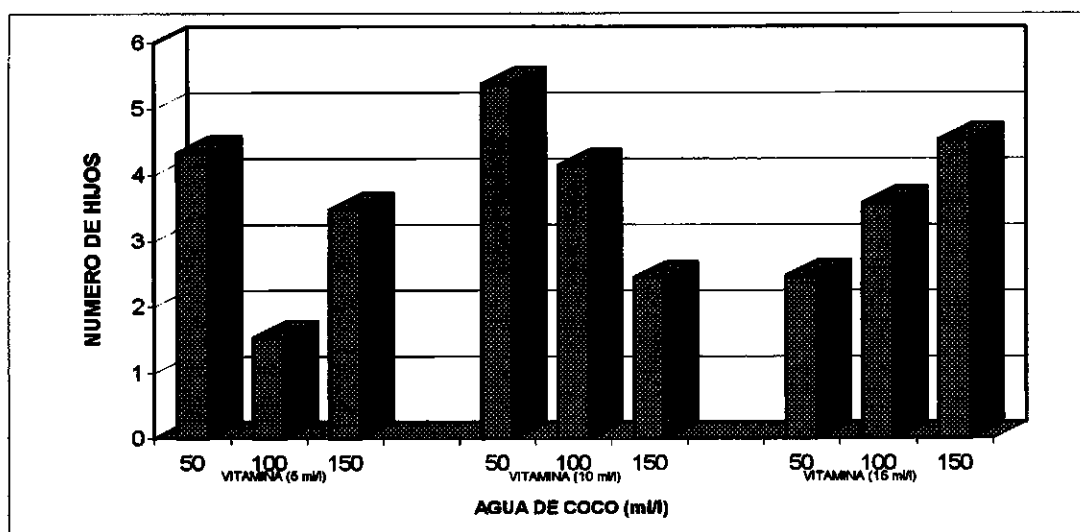
SACAROSA (g/l)	AGUA DE COCO (ml/l)			VITAMINA (ml/l)
	50	100	150	
15	1.07 bc*	0.33 c	3.30 ab	5
15	0.93 b	2.90 abc	2.90 abc	10
15	0.57 c	0.13 a	2.20 bc	15
30	4.33 ab	1.53 b	3.47 ab	5
30	5.37 a	4.13 ab	2.43 b	10
30	2.46 b	3.57 ab	4.53 ab	15
45	2.83 ab	1.20 b	4.27 a	5
45	3.50 ab	3.21 ab	3.04 ab	10
45	1.83 ab	1.67 b	3.67 ab	15

\* Prueba de DUNCAN: Promedios con letras iguales no difieren estadísticamente.



**Figura 26. Número promedio de hijos por planta bajo la interacción de 15 g/l de sacarosa con diferentes niveles de agua de coco y vitamina.**

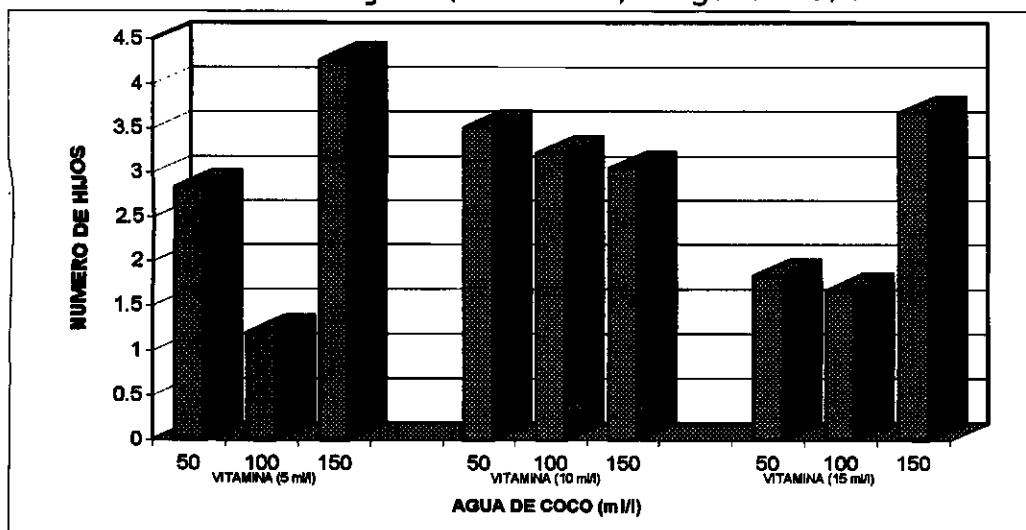
Comparando el nivel de sacarosa 30 g/l con los diferentes niveles de agua de coco y vitamina se notó que el mayor promedio de hijos lo proporcionó el tratamiento 30 g/l de sacarosa, 50 ml/l de agua de coco y 10 ml/l de vitamina con 5.37 hijos seguido del tratamiento 30 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco y 15 ml/l de vitamina con 4.53 hijos, el menor valor fue del tratamiento 30 g/l de sacarosa, 100 ml/l de agua de coco y 5 ml/l de vitamina con 1.53 hijos (tabla 22; figura 27).



**Figura 27. Número promedio de hijos por planta bajo la interacción de 30 g/l de sacarosa con diferentes niveles de agua de coco y vitamina.**

Haciendo la comparación del nivel de sacarosa 45 g/l con los diferentes niveles de agua de coco y vitamina resultó que el tratamiento 45 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco y 5 ml/l de vitamina se ubica en la primer categoría estadística con 4.27 hijos. En la última categoría estadística se encuentra el tratamiento 45 g/l de sacarosa, 100 ml/l de agua de coco y 5 ml/l

de vitamina con 1.2 hijos (tabla 22; figura 28).



**Figura 28. Número promedio de hijos por planta bajo la interacción de 45 g/l de sacarosa con diferentes niveles de agua de coco y vitamina.**

Comparando los tres niveles de sacarosa con respecto a los diferentes niveles de agua de coco y vitamina el mejor fue el tratamiento 30 g/l de sacarosa, 50 ml/l de agua de coco y 10 ml/l de vitamina con 5.37 hijos promedios por planta (tabla 22).

## IV. DISCUSION

### 4.1- Efecto de diferentes grados de pH en el cultivo *in vitro* de quequisque.

La multiplicación *in vitro* de plantas se puede realizar a través de tres métodos: embriogénesis somática, inducción a brotes adventicios y el aumento de la proliferación de yemas axilares (Murashige y Skoog, 1962). Los resultados expuestos son un ejemplo del tercer proceso.

En las aráceas el cormo principal representa el tallo del cual salen los demás órganos de las plantas (raíces, hojas, cormelos).

Según Arditti et al; (1979) se ha observado una alta especificidad de las aráceas en los requerimientos para su cultivo *in vitro*, por consiguiente nos dimos a la tarea de averiguar las condiciones adecuadas que el cultivo puede requerir.

Una de éstas condiciones es el grado de acidez o alcalinidad (pH) del medio de cultivo; éste es importante y específico para cada tipo de planta al igual que ocurre en el suelo, por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio (Abdelnour y Vincent, 1994).

Murashigue y Skoog (1962) sugieren el uso del pH  $5.7 \pm 0.1$  en la micropropagación de la mayoría de cultivos comestibles. Sin embargo se encontró que con el uso del pH 6.7 se obtuvo mejores resultados en las variables altura de planta, número de hojas, número de hijos excepto en el número de raíces (figuras 1, 2, 3 y 4).

Esta discrepancia se sustenta en el hecho de que las plantas por sus características genotípicas se comportan de diferentes maneras aun estando bajo las mismas condiciones ambientales (Hurtado y Merino, 1994).

El genotipo es probablemente el factor que más influye en el crecimiento y morfogénesis *in vitro*. Generalmente géneros de diferentes especies o hasta variedades de la misma especie requieren sustratos y condiciones físicas diferentes para un desarrollo óptimo debido a sus diferentes genotipos (Cisne, 1988).

La alta especificidad de las aráceas ya antes mencionada y el hecho de que una especie en particular pueda reaccionar favorablemente a un conjunto de condiciones mientras que otras puedan no hacerlo (Seibert y Kadkade ; 1980; Martin, 1980) apoya los resultados obtenidos en nuestra investigación.

Según Devlin, (1979) la ionización de electrolitos o los números de valencias de los distintos iones están influenciados por cambios de pH.

Es notorio observar que cuando se cambió el pH por arriba de 6.7 o por debajo de 5.7 se disminuyeron los valores de las variables evaluadas (figuras 1,2,3,4).

Esta disminución se debió a que el incremento del pH favorece la absorción de cationes pero detiene la absorción de aniones y viceversa (Robertson, 1958). Por consiguiente no existió un balance nutricional que permitiera obtener resultados óptimos.

El pH del medio debe ser tal que no dañe la función de la membrana celular del citoplasma. Dentro de estos límites fisiológicos su valor afecta la solubilidad de las sales, la absorción de los ingredientes del medio, los reguladores de crecimiento y la eficacia gelificante del agar (Cisne, 1988).



#### **4.2- Efecto de macro y micronutrientes en la propagación *in vitro* de quequisque.**

Las células y tejidos vegetales para su crecimiento y desarrollo requieren una variedad de nutrientes orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se manifiestan fácilmente en órganos y tejidos de plantas superiores e inferiores. Los nutrientes orgánicos, al igual que los inorgánicos se requieren en dos niveles: uno macro y otro micro (Krikorian, 1991).

Generalmente las células en crecimiento pueden fabricar sus proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbono hidratados suministrados por el medio de cultivo; sin embargo, existen además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son activas en el crecimiento. El objetivo de un medio de cultivo es suministrar los nutrientes minerales en concentraciones adecuadas. Se deben incluir los macroelementos (C, H, O, P, K, N, S, Ca y Mg) y los microelementos (B, Zn, Mn, Cu, Mo, Fe y Cl) (Krikorian, 1991).

En nuestro estudio con el uso de 50, 90 y 130 % de macronutrientes del medio MS se encontró efecto significativo únicamente en las variables número de raíz y número de hojas, en ambos casos los mejores resultados se obtuvieron con el nivel 50 % (tabla 7; figura 5).

La raíz tiene relación directa con las hojas debido a la fotosíntesis y transpiración. Todos los elementos esenciales son

absorbidos por las raíces excepto el carbono, hidrógeno y oxígeno que son absorbidos por las hojas (Holman y Robbins, 1971).

Raíces y hojas son las encargadas una de absorber agua y minerales que la otra transformará a través de la fotosíntesis en energía metabólica. Del buen funcionamiento de éstos órganos depende en gran medida el crecimiento y desarrollo general de la planta.

Es por eso que con el uso de concentraciones más bajas de macronutrientes se estimula la formación de raíces y hojas para absorber y metabolizar lo que el medio no es capaz de suministrar.

Los micronutrientes esenciales que generalmente se encuentran presentes en los medios nutritivos son componentes de proteínas de importancia fisiológica y metabólica, cada una tiene su función específica que incide sobre la morfogénesis y crecimiento (Cisne, 1988).

Los microelementos presentan un problema especial. Se supone que todos lo conocidos y necesarios para las plantas enteras lo son también para las células y tejidos cultivados; sin embargo, los estudios detallados de Steward et al; (1968) se relacionan solamente con los requerimientos de Mo, Mn, Cu y Fe.

En nuestro estudio encontramos que los niveles 50, 90 y 130 % de micronutrientes del medio MS no presentaron diferencias

significativas sobre las variables evaluadas. Además no se registró efecto significativo de interacción entre macro y micronutrientes (tabla 7).

Los resultados expuestos en ningún momento nos pueden llevar a pensar que los macro y micronutrientes no son esenciales en la propagación *in vitro* de quequisque, debemos tomar en cuenta que el medio que propusieron Murashige y Skoog (1962) es esencialmente una modificación de la fórmula basal original de White a la que se añadieron 1650 mg/l de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , al igual que 170 mg/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El  $\text{CaCl}_2$  reemplazó al  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ; por consiguiente, este medio es de alta salinidad y puede esperarse que sustente el crecimiento de ciertos cultivos que requieren concentraciones más altas de iones (Krikorian, 1991).

#### 4.3- Efecto de diferentes niveles de sacarosa, agua de coco y vitamina a través del tiempo.

Los azúcares son producto de la fotosíntesis proceso por medio del cual la planta convierte el dióxido de carbono y agua en carbohidratos con ayuda de la clorofila y la luz (Abdelnour y Vincent 1994); sin embargo, Mroginski (1991) asegura que muy pocos cultivos *in vitro* son autótrofos y por lo tanto es necesario agregar al medio una fuente de carbono.

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente usada y se emplea en una concentración de 2-3 %; sin embargo, en ciertas especies se emplean concentraciones muy elevadas de 5-12 % (Merino, 1994).

En este estudio se observó que la sacarosa tuvo efecto sobre las variables evaluadas, ejerciendo mayor influencia en la altura de planta y número de hijos la concentración 30 g/l (figuras 6,23) coincidiendo con lo recomendado por Murashige y Skoog (1962).

En el número de raíces y hojas las mejores respuestas se obtuvieron con 45 y 15 g/l respectivamente (figuras 10, 20). Con éstos resultados se determinó la importancia de la sacarosa como fuente de carbono para dar respuesta organogénica en el cultivo *in vitro*, debido a que influyó en la división, alargamiento celular, así como en la formación de hojas y raíces.

Una gran variedad de sustancias de composición indefinida han sido utilizadas para enriquecer los medios de cultivos entre ellas el agua de coco (Abdelnour y Vincent, 1994).

El agua de coco es un medio muy complejo con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos; tiene buena capacidad de amortiguación (buffer) y no es raro encontrar sales en ellas (Krikorian, 1991).

La concentración 150 ml/l de agua de coco experimentó resultados satisfactorios sobre las variables altura de planta, número de raíz y número de hijos (figuras 6, 10, 23) debido a que ésta sustancia tiene efectos sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas dado a su potencial para inducir la división celular en tejidos diferenciados (Krikorian, 1991).

Según nuestros resultados el agua de coco no es de gran influencia en la formación de hojas ya que con el uso máximo 150 ml/l y el mínimo 50 ml/l se produjeron 1.8 y 2 hojas respectivamente lo que no refleja a nuestro criterio gran diferencia (tabla 16; figura 20). Además no presentó efecto significativo en interacción con la sacarosa, vitaminas y tiempo.

Aunque todavía no se conocen completamente todas las funciones del agua de coco su uso se justifica no solo por su excelente capacidad amortiguadora sino también por sus cualidades promotoras de crecimiento. Además, en aquellas áreas donde crece, el coco es significativamente más barato que compuestos

purificados o sintéticos tales como la zeatina o el inositol (Krikorian, 1991).

Las plantas verdes se consideran normalmente autótrofas para las vitaminas, pero puede ser necesario añadir al medio alguna de ellas hasta cuando los cultivos crezcan o se hallan vuelto verdes. En la mayoría de los medios, la tiamina, la piridoxina y el ácido nicotínico se consideran benéficos y se añaden de forma rutinaria por conveniencia (Krikorian, 1991).

Sin embargo, la vitamina que se ha demostrado consistentemente como importante en el cultivo del tejido es la tiamina (Abdelnour; Vincent, 1994).

En el estudio realizado pudimos observar que la concentración 10 ml/l de tiamina estimuló la altura de planta y el número de hijos (figuras 6,23) en comparación con las demás concentraciones de tiamina usadas en esta etapa. Dicho resultado coincide con lo recomendado por Murashige y Skoog (1962). Sin embargo, para el número de raíces y número de hojas las concentraciones de vitamina estudiadas no presentaron efecto significativo.

El tiempo es indiscutiblemente un factor que influye en la formación, crecimiento y desarrollo de todos los organismos vivientes. Por consiguiente era de esperarse que presentara efecto sobre las variables evaluadas en la propagación *in vitro* de quequisque. Es notorio observar el efecto directamente

proporcional del tiempo en la organogénesis del cultivo (figuras 6, 10, 20, 23).

Morfogénesis directa o indirecta son muy influenciadas por un balance correcto entre constituyentes orgánicos e inorgánicos y reguladores de crecimiento (Cisne, 1988). Es por eso que más importante que los efectos simples son los efectos de interacción que presentaron las fuentes de variación en estudio.

La interacción sacarosa\*agua de coco\*vitamina fue relevante en la inducción de altura promedio por planta, número promedio de raíces y número promedio de hijos. Sin embargo, para cada variable los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones diferentes.

La mayor altura de planta se produjo con la combinación 45 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco y 10 ml/l de vitamina (tabla 9; figura 9). En el número de raíces las concentraciones de sacarosa y agua de coco fueron las mismas que en la altura de planta; pero fue necesario 15 ml/l de vitamina para obtener los mejores resultados.

Es interesante observar que para esta variable la vitamina presentó efecto significativo solamente en interacción con la sacarosa y el agua de coco.

Tomando en cuenta el efecto simple del agua de coco en el número de hijos la mejor concentración fue 150 ml/l; en interacción con 30 g/l de sacarosa, la concentración de agua de

coco bajó a 50 ml/l . Cuando interactuó con la vitamina sin tomar en cuenta la sacarosa los requerimientos de agua de coco para alcanzar los mejores resultados aumentaron a 150 ml/l, pero tomando en cuenta la interacción sacarosa\*agua de coco\*vitamina la concentración de agua de coco bajó nuevamente a 50 ml/l, lo que nos indica que en presencia de 30 g/l de sacarosa no son necesarias altas concentraciones de agua de coco quizá porque ésta contiene alrededor de 2.5 % de azúcar (Krikorian, 1991).

Por otro lado se observó que la interacción 45 g/l de sacarosa\*150 ml/l de agua de coco\*42 ddi fue el que mejor comportamiento presentó en el número promedio de raíces por planta. Estas concentraciones coinciden con los efectos simples y dobles de sacarosa\*tiempo y sacarosa\*agua de coco en el número de raíces.

En la variable número de hojas las interacciones que presentaron efectos significativos fueron sacarosa\*vitaminas y sacarosa\*tiempo. En ambos casos la concentración de sacarosa requerida fue 15 g/l.

Es importante señalar que altas concentraciones de sacarosa, agua de coco y vitamina disminuyen la formación de hojas. Los mejores resultados de esta variable se alcanzaron con las más bajas concentraciones usadas de cada fuente de variación. Este resultado se debe a que cuando disminuimos las concentraciones de estas sustancias que son fuentes de carbono, inducen la división celular e influyen en el metabolismo, la planta se ve obligada a



desarrollar mayor número de hojas para sintetizar los nutrientes que necesita y compensar de alguna forma estas bajas concentraciones.

## **V. CONCLUSIONES**

- 1- Los medios de cultivo ajustados a pH 6.7 indujeron los mejores resultados en las variables altura promedio de planta, número promedio de hojas y número promedio de hijos por planta.
- 2- La variable número promedio de raíces por planta se comportó mejor en los medios de cultivo con pH ajustado a 5.7
- 3- Las diferentes concentraciones de macronutrientes en estudio, indujeron diferencias estadísticas significativas solamente en las variables número promedio de hojas y número promedio de raíces por planta.
- 4- La adición de 50 % de macronutrientes de las sales MS al medio de cultivo estimuló la formación de hojas y raíces
- 5- Las diferentes diluciones de micronutrientes de las sales MS adicionadas al medio, no indujeron diferencias estadísticas significativas en los datos de las variables evaluadas.
- 6- Las combinaciones de las diferentes diluciones de los macro y micronutrientes estudiadas no estimularon efectos estadísticos significativos en las variables evaluadas.

- 7- Las plantas de quequisque desarrolladas en un medio de cultivo donde se utilizaron diferentes concentraciones de sacarosa, agua de coco y momentos de evaluación, reportaron diferencias estadísticas significativas en todas las variables evaluadas.
- 8- Las concentraciones de vitaminas estudiadas fueron significativas solamente para las variables altura de planta y número de hijos, presentando resultados satisfactorios con 10 ml/l en ambos casos.
- 9- El momento de evaluación fue la única fuente de variación que ejerció una influencia constante y homogénea sobre el comportamiento en todas las variables con el uso de 42 ddi
- 10- En la variable número de hojas las concentraciones más bajas de sacarosa, agua de coco y vitamina indujeron los mejores resultados.
- 11- La interacción 30 g/l de sacarosa, 50 ml/l de agua de coco y 10 ml/l de vitamina a los 42 ddi indujeron el mayor número de hijos por planta.
- 12- En la variable número de raíces la interacción 45 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco a los 42 ddi presentó los mejores resultados.

13- El mayor promedio de altura por planta se obtuvo con la interacción 45 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco y 10 ml/l de vitamina.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- 1- Ajustar el pH del medio nutritivo a 6.7 en la propagación *in vitro* de quequisque.
- 2- Para obtener mayor número de hojas y raíces utilizar el 50 % de macronutrientes de las sales MS.
- 3- Someter a estudio rangos mayores de micronutrientes para conocer hasta que punto se encuentran sus efectos simples y de interacción con los macronutrientes.
- 4- Utilizar 30 g/l de sacarosa, 50 ml/l de agua de coco y 10 ml/l de vitamina para obtener el mayor número de hijos a los 42 ddi si el objetivo que se persigue es de propagación comercial acelerada.
- 5- Realizar estudios para comprobar la efectividad de las concentraciones 45 g/l de sacarosa, 150 ml/l de agua de coco a los 42 ddi en la fase de enraizamiento dado a que en la fase de propagación proporcionó el mayor número de raíces.

## **VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- ABDELNOUR, A; VINCENT, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Costa Rica. Pp. 7-17.
- ARDITTI, J.; STRAUSS, M.S. 1979. Taro tissue culture manual. U.S.A. South Pacific Commission. Manual N° 671. 59 pp.
- BLANCO, M. 1992. Raíces y tubérculos. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. Pp. 81-125
- CIAT, 1980. El cultivo de meristema de yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 40 pp.
- CISNE, J.D. 1988. Introducción a la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Tesis Ing. Agrónomo. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Producción Vegetal. Managua, Nicaragua. 89 pp.
- CORONEL, C. 1996. Situación de la producción de quequisque en Nicaragua. Centro de Exportaciones e Inversiones (CEI). Entrevista personal.
- DEVLIN, R.M. 1979. Nutrición mineral: absorción y transporte de las sales minerales. En: Fisiología vegetal. Robert M. Devlin. Edit. Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. Pp. 256-279.

- GAMBORG, O.L.; MURASHIGE, T.; THORPE, T.A. y VASIL, I.K. 1976.  
Plant tissue culture media *in vitro*. 12: 473-478.
- HARTMAN, R.D. 1974. Dasheen mosaic virus and other  
phytopathogens eliminated from caladium, taro, and cocoyam  
by culture of shoot tips. *Phytopathology* 64: 236-240.
- HICKS, G.S. 1980. Patterns of organ development in plant tissue  
culture and the problem of organ determination. *The  
Botanical Review*. 46 (1) : 1-23.
- HOLMAN, R.M.; ROBBINS, W.W. 1971. La raíz. En. *Botánica  
General*. Ed. Pueblo y Educación. La Habana, Cuba.  
Pp. 191-195.
- HUGHES, K.W. 1981. Ornamental species. In. Conger, B.V. (ed).  
*Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. CRC  
Press, Boca Ratón, Florida, Estados Unidos.
- HURTADO M.D.V.; MERINO, M.E. 1994. Cultivo de tejidos  
vegetales. 4a ed. México, Trillas. 232 pp.
- HUSSEY, G. 1978. *In vitro* propagation of the onion *Allium cepa*  
by axillary and adventitious shoot proliferation.  
*Scientia Hort*. 9:227-236.

- KRIKORIAN, A.D. 1991. Medios de Cultivo: generalidades, composición y preparación. En. Cultivo de tejidos en la Agricultura. William M. Roca; Luis A. Mrogrinski. CIAT. Colombia. Pp. 41-77.
- LEVY, D. ; KEDAR, N. ; KARACINQUE, R. 1973. Effect of ethephon on bulbing of onion under noninductive photoperiod. Hort Science 8:228-229.
- MARTIN, S.M. 1980. Enviromental factors: temperature, aereation and pH. IN. Staba, E. J. (ed). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. Pp. 143-148.
- MERINO, M. M. 1994. Medio de cultivo. En: Cultivo de tejidos vegetales. Daniel V. Hurtado; María E. Merino. Trillas, Mexico. Pp. 67-84.
- MONGE, M.; ARIAS, O.; RAMIREZ, P. 1987. Obtención de plantulas de tiquisque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*), de tiquisque morado (*Xanthosoma violaceum*) y de ñampi (*Colocasia esculenta*) libres de virus por medio del cultivo *in vitro* de ápices. Agronomía Costarricense 11(1): 71-79.



- MONTALDO, A. 1983. Cultivos pantropicales de raíces y tubérculos. En: Cultivo de raíces y tuberculos tropicales. Alvaro Montaldo. IICA. San José, Costa Rica. Pp. 15-23.
- MURASHIGE, T. y SKOOG, F. 1962. A revised medium, for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture. *Physiologi Plantarum*. 15:473-497.
- MURASHIGE, T. 1978. The impact of plant tissue culture on agriculture. In. Thorpe, T. A. (ed). *Frontiers of plant tissue culture*. University of Calgary. Calgary, Canadá. Pp. 15-26.
- MROGINSKI, L. A. ; ROCA, W. M. 1991. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En. Cultivo de tejidos en la agricultura. William M. Roca. ; Luis A. Mroginski. CIAT. Colombia. Pp. 19-40.
- NOVAK, F. J. ; PETRU, E. 1981. Tissue culture propagation of *Lilium hybrids*. *Scientia Hort*. 14:191-199.
- ONWENE, I. C. 1978. The tropical tuber crops: yams, cassava, sweet potato, cocoyam. New York, Willey. Pp. 234-236.
- PEDROZA, H. 1993. Tecnicas de separación de medias. En: *Fundamentos de Experimentación Agrícola*. Henry Pedrosa. Cecotropic. Managua, Nicaragua. Pp. 110-128.

- PIERIK, R. L. M. ; WOETS, J. 1971. Regeneration of insolated bulb scale segments of *Hyacinth*. Acta Hort. 23: 423-428.
- PIERIK, R. L. M. ; RUIBING, M. A. 1973. Regeneration of bulblets on bulb scale segments of *Hyacinth*. Neth. J. Agr. Sci. 21:129-138.
- RAMIREZ, P. 1987. Aislamiento y caracterización del Virus del Mosaico del "Dasheen" (DMV) en Costa Rica. 10pp.
- ROBERTSON, R. N. 1958. The uptake of minerals. In. W. Ruhland (ed.), Encyclopedia of plant physiology. Springer, Berlin. 4:243-244.
- SALAZAR, S. 1991. Micropropagación de Aráceas comestibles. En. Cultivo de tejidos vegetales en la agricultura. Fundamentos y aplicación. Ed. por William Roca y Luis Mroginski. CIAT. Cali, Colombia. Pp. 470-478.
- SEIBERT, N. ; KADKADE, P. G. 1980. Enviromental factors; A: Light. In. Staba, E. J. (ed). Plant tissue culture as a source of biochemicals. CRC Press, Boca Ratón, Florida, E.U. Pp. 123-141.
- STEWART, F. C.; NEUMANN, K. H.; RAO, K. V. N. 1968. Investigation the growth and metabolism of cultured explants of *Daucus carota*; II: Effects of iron, molibdenum and magnese on metabolism. Planta (Berlín) 81:351-371.

- STIMART, D. P.; ASHER, P. D. 1981. Developmental responses of *Lilium longiflorum* bulblets to constant or alternating temperatures *in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 106: 450-454.
- TAKAYAMA, S. ; MISAWA, M. 1982. Regulation of organ formation by cytokinin and auxin in *Lilium bulbiscales* grown *in vitro*. Plant Cell Physiol. 23:67-74.
- THORPE, T. A. 1983. Biotechnological applications of tissue culture to forest tree improvement. In: Biotechnological Advances. V. 1. Pp. 263-278.
- VILLALOBOS, A. V. M. y THORPE , T. A. 1991. Micropropagación: Conceptos, metodología y resultados. En. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William M. Roca y Luis Mroginski. CIAT. Cali, Colombia. Pp. 127-141.
- WONG, W. C. 1986. *In vitro* propagation of banana (*Musa spp.*): initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. Plant cell, tissue and organ culture 6(2): 159-166.