



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMIA**

**TESIS DE GRADO**

**INDUCCIÓN DE CALLOS Y MICROPROPAGACIÓN A  
PARTIR DE YEMAS ADVENTICIAS DE DOS  
CULTIVARES DE QUEQUISQUE (*Xanthosoma sagittifolium*  
(L.) SCHOTT)**

**AUTORES**

**Br. MARCO TULIO MURILLO TABLADA**  
**Bra. ARELYS DANIELA SUÁREZ MARTÍNEZ**

**ASESOR**

**Ing. Agr. MSc. GUILLERMO REYES CASTRO**

**MANAGUA, SEPTIEMBRE, 2001**

*“Todo hombre debe decidir una vez en su vida:  
Lo arriesga todo o se sienta a  
contemplar el paso de los triunfadores”.*

*Autor desconocido*

## Índice general

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
Índice general. . . . .	<i>i</i>
Índice de tablas. . . . .	<i>iii</i>
Índice de figuras. . . . .	<i>v</i>
Índice de anexos. . . . .	<i>vi</i>
Dedicatoria. . . . .	<i>viii</i>
Agradecimiento. . . . .	<i>x</i>
Resumen. . . . .	<i>xii</i>
<b>I. Introducción. . . . .</b>	<b>1</b>
Objetivos. . . . .	5
Hipótesis. . . . .	5
<b>II. Revisión bibliográfica. . . . .</b>	<b>6</b>
2.1 Antecedentes del cultivo de tejidos en la inducción de callos en los géneros <i>Xanthosoma</i> y <i>Colocasia</i> . . . . .	6
2.2 Antecedentes del cultivo de tejidos en la inducción de yemas adventicias en <i>Xanthosoma</i> . . . . .	7
<b>III. Materiales y métodos. . . . .</b>	<b>9</b>
3.1 Materiales y equipos. . . . .	9
3.2 Medidas de asepsia. . . . .	9
3.3 Medio de cultivo. . . . .	10
3.4 Manejo del tejido. . . . .	10
3.5 Estudios realizados. . . . .	11
3.5.1 Ensayos de inducción de callos. . . . .	11
3.5.1.1 Inducción de callos a partir de explantes de hojas . . . . .	11
3.5.1.2 Inducción de callos a partir de explantes de ápices y peciolo . . . . .	13
3.5.1.3 Estudios exploratorios de inducción de callos. . . . .	14

3.5.1.3.1	Efecto del uso del medio fresco como inductor de callos. . . . .	14
3.5.1.3.2	Uso del cultivo de meristemos en la inducción de callos. . . . .	14
3.5.2	Micropropagación a partir de yemas adventicias. . . . .	15
3.5.2.1	Inducción de yemas adventicias a partir de ápices de quequisque. . . . .	15
3.5.2.2	Generación de plantas a partir de yemas adventicias. . . . .	16
3.6	Variables evaluadas y análisis de datos. . . . .	16
<b>IV.</b>	<b>Resultados y discusiones. . . . .</b>	<b>18</b>
4.1	Resultados y discusión de inducción de callos. . . . .	18
4.1.1	Inducción de callos a partir de hojas. . . . .	18
4.1.2	Inducción de callos a partir de ápices. . . . .	20
4.1.3	Inducción de callos a partir peciolos. . . . .	21
4.1.4	Estudio exploratorio en la inducción de callos. . . . .	23
	Efecto del medio fresco como inductor de callos a partir de hojas y peciolos. . . . .	23
	Uso del cultivo de meristemos en la inducción de callos. . . . .	23
4.1.5	Discusión de inducción de callos. . . . .	24
4.2	Resultados y discusión de el estudio de micropropagación a partir yemas adventicias. . . . .	26
4.2.1	Inducción de yemas adventicias. . . . .	26
4.2.2	Generación de plantas <i>in vitro</i> a partir de yemas adventicias. . . . .	28
4.2.3	Discusión del estudio de micropropagación a partir de yemas adventicias. . . . .	29
<b>V.</b>	<b>Conclusiones. . . . .</b>	<b>30</b>
5.1	Inducción de callos. . . . .	30
5.2	Micropropagación a partir de yemas adventicias. . . . .	30
<b>VI.</b>	<b>Recomendaciones. . . . .</b>	<b>32</b>
<b>VII.</b>	<b>Bibliografía. . . . .</b>	<b>33</b>

## Indice de tablas

Tabla	Contenido	Página
1.	Tipos de explantes, medios de cultivo, reguladores de crecimiento utilizados en la inducción de callos en los géneros <i>Xanthosoma</i> y <i>Colocasia</i>	7
2.	Tipos de explantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento utilizados en la inducción de yemas adventicias en <i>Xanthosoma</i>	8
3.	Factores estudiados en el ensayo de inducción de callos a partir de explantes de hojas de quequisque	12
4.	Medios de cultivo empleados en el ensayo de inducción de callos a partir de explantes de hojas en los genotipos de quequisque Blanco y Masaya	12
5.	Factores estudiados en el ensayo de inducción de callos a partir de explantes de ápices y peciolo de quequisque	13
6.	Medios de cultivo empleados en el ensayo de inducción de callos a partir de explantes de ápices y peciolo de quequisque	13
7.	Factores estudiados en el ensayo del efecto del uso del medio fresco como inductor a callos	14
8.	Secuencias de cultivo empleadas en el ensayo del efecto del uso del medio fresco como inductor de callos a partir de hojas y peciolo en los genotipos de quequisque Blanco y Masaya	14

9.	Factores estudiados en el ensayo del uso del cultivo de meristemos en la inducción de callos	15
10.	Medios de cultivo empleados en el ensayo del uso del cultivo de meristemos en la inducción de callos en los genotipos de quequisque Blanco y Masaya	15
11.	Factores estudiados en el ensayo de inducción de yemas adventicias a partir de explantes de ápices de quequisque	15
12.	Medios de cultivo empleados en la inducción de yemas adventicias a partir de explantes de ápices en los genotipos de quequisque Blanco y Masaya, más 1 mgL <sup>-1</sup> de AIA	16
13.	Porcentaje de callos obtenidos en el ensayo del uso de medio fresco MS (1962) + 2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> ) y Zeatine riboside (0.8 mgL <sup>-1</sup> ) a partir de explantes de hojas y peciolo de plantas <i>in vitro</i> de dos cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott)	23
14.	Porcentaje de callos obtenidos en el ensayo del efecto del cultivo de meristemos de dos cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott) en tres medios de cultivo MS (1962)	23
15.	Porcentaje de plantas <i>in vitro</i> generadas a partir de yemas adventicias utilizando el medio (MS (1962) + AIA 1.5 mgL <sup>-1</sup> + 6-BAP 0.5 mgL <sup>-1</sup> ).	28

## Indice de figuras

Figura	Contenido	Página
1.	Porcentaje de explantes de hojas verdes, amarillos, y necrosados, como resultado del efecto de las combinaciones de ANA, 2,4-D y 2,4,5-T (1, 3 y 5 mgL <sup>-1</sup> ) con 6-BAP (0, 1 y 3 mgL <sup>-1</sup> ) en dos cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott)	19
2.	Porcentaje de callos inducidos a partir de ápices de plantas <i>in vitro</i> en dos cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott) estudiados en medio MS (1962) a diferentes niveles de AIA y 2,4-D (1, 3 y 5 mgL <sup>-1</sup> ) en combinación con kinetina (0, 1 y 3 mgL <sup>-1</sup> ) en la inducción de callos	21
3.	Porcentaje de callos inducidos a partir de pecíolos de plantas <i>in vitro</i> en dos cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott) cultivados en medios MS (1962) a diferentes niveles de AIA y 2,4-D (1, 3 y 5 mgL <sup>-1</sup> ) en combinación con kinetina (0, 1 y 3 mgL <sup>-1</sup> )	22
4.	Efecto de tres niveles de Kinetina y 6-BAP (3, 5, 10 mgL <sup>-1</sup> ) en combinación con AIA (1 mgL <sup>-1</sup> ) en la inducción de yemas adventicias a partir de explantes de ápices de plantas <i>in vitro</i> en dos cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott).	27

## Índice de anexos

Anexo	Contenido	Página
I.	Tabla 16. Porcentaje de explantes de hojas verdes, amarillos y necrosados, como resultado del efecto de las combinaciones de ANA, 2,4-D y 2,4,5-T (1, 3 y 5 mgL <sup>-1</sup> ) con 6-BAP (0, 1 y 3 mgL <sup>-1</sup> ) en el cultivar Blanco de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott)	40
II.	Tabla 17.) Porcentaje de explantes de hojas verdes, amarillos y necrosados, como resultado del efecto de las combinaciones de ANA, 2,4-D y 2,4,5-T (1, 3 y 5 mgL <sup>-1</sup> ) con 6-BAP (0, 1 y 3 mgL <sup>-1</sup> ) en el cultivar Masaya de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott)	41
III.	Tabla 18. Efecto del cultivo de ápices en el medio MS (1962) adicionado con AIA y 2,4-D (1, 3 y 5 mgL <sup>-1</sup> ) en combinación con Kinetina (0, 1 y 3 mgL <sup>-1</sup> ) en la inducción de callos en dos cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott)	42
IV.	Tabla 19. Efecto del cultivo de pecíolos en el medio MS (1962) adicionado con AIA y 2,4-D (1, 3 y 5 mgL <sup>-1</sup> ) en combinación con Kinetina (0, 1 y 3 mgL <sup>-1</sup> ) en la inducción de callos en dos cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott)	43

V.	Tabla 20. Efecto del cultivo de ápices en el medio MS (1962) adicionado con Kinetina y 6-BAP (3, 5 y 10 mgL <sup>-1</sup> ) en combinación con AIA (1 mgL <sup>-1</sup> ) en la inducción de yemas adventicias en dos cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott)	44
VI.	Tabla 21. Contenido químico del medio básico de cultivo de Murashige y Skogg (1962)	45
VII.	Figura 5. Callos producidos a partir de ápices de quequisque	46
	Figura 6. Yemas adventicias producidas a partir de ápices de quequisque	46
VIII.	Figura 7. Esquema de inducción de callos y micropropagación a partir de yemas adventicias de dos cultivares de quequisque ( <i>Xanthosoma sagittifolium</i> (L.) Schott)	47

## **DEDICATORIA**

A mi madre

Zayra Tablada Cajina

A mi tía

Alcira Tablada Cajina

A la memoria de mi abuelita

Adilia Cajina vda. de Tablada

A mi hermano

William Picado Tablada

**Marco Tulio Murillo Tablada**

## **DEDICATORIA**

**A mis padres:**

Carlos José Suárez Gutiérrez

Vilma Gertrúdis Martínez Dávila

**A mis hermanos:**

Raquel Johanna Suárez Martínez

Jonathan Vladimir Suárez Martínez

Chelibeth Massiel Suárez Martínez

**A todas aquellas personas que se sienten orgullosas de mis triunfos**

**Arelys Danelia Suárez Martínez**

## **AGRADECIMIENTO**

A mis tíos, Jorge Tablada Cajina y Roque Núñez Villalta, por ser el ejemplo de padres y amigos

A mis primos René Javier Núñez, Juan Carlos Núñez y Leo Enrique Tablada; por ser mis hermanos, mis amigos de toda la vida

A mi asesor Ing. Agr. MSc. Guillermo Reyes Castro, por ser más que un profesor, un verdadero amigo

Al Programa de doctorado (PhD-UNA) y al Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), por haber financiado el presente estudio

Al profesor Ing. Agr. Marbell Aguilar, por el apoyo brindado en la realización de este trabajo

De forma especial a mi compañera de tesis Arellys Suárez Martínez, por su amistad

**Marco Tulio Murillo Tablada**

## **AGRADECIMIENTO**

**A Dios que me dio fuerza, voluntad y capacidad para culminar con éxito mis estudios.**

**A mis padres que son en mi vida el pilar, valuarte y la fuente de inspiración.**

**A cada uno de los maestros (as) que contribuyeron a mi formación intelectual desde mis primeros grados hasta los que participaron en mis estudios universitarios, de manera especial a mi asesor Ing. Agr. MSc. Guillermo Reyes Castro no solo por haber sido el maestro, sino también el amigo.**

**Ing. Agr. Marbell Aguilar por su constante e incondicional colaboración al presente trabajo.**

**Ing. Edwin Castro Rivera por su colaboración económica y confianza depositada en mi persona.**

**Al Programa de doctorado (PhD-UNA) y al Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), por haber financiado el presente estudio.**

**A mi compañero de tesis Marco Tulio Murillo Tablada por su amistad.**

**Por que no puedo olvidar a esas personas que me brindaron su amistad, me contagiaron de su ánimo y creyeron en mi, gracias.**

**Arelys Danelia Suárez Martínez**

## Resumen

El presente estudio tuvo el objetivo de determinar el efecto combinado de los reguladores de crecimiento, tipos de explantes y genotipos estudiados en la inducción de callos y la micropropagación a partir de (YA) (inducción de yemas adventicias y generación de plantas), en los genotipos de quequisque Blanco y Masaya (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). En el estudio de inducción de callos, se evaluaron medios de cultivo, tipos de explantes (hojas, ápices, peciolo y meristemos), uso de medios fresco y genotipos. En la fase de inducción de yemas adventicias se evaluaron medios de cultivos y genotipos; en la generación de plantas se utilizó un medio de cultivo (AIA 1.5 mgL<sup>-1</sup> + 6-BAP 0.5 mgL<sup>-1</sup>). Para el análisis se representó gráficamente los datos no paramétricos evaluados en los diferentes estudios. Se obtuvo callos a partir de ápices, peciolo y meristemos, excepto en hojas. Los ápices presentaron mayor potencial para la formación de callos. El 2,4-D (1 – 5 mgL<sup>-1</sup>) fue la auxina que indujo a callos en un mayor número de medios, observándose la formación de callos en un promedio de 38.88 % de los medios que contenían 2,4-D a partir de explantes de ápices y 5.55 % en peciolo. El medio que contenía 6-BAP (2 mgL<sup>-1</sup>) indujo a callos en un promedio de 62.5 % de los meristemos de ambos genotipos. Al trasladar los explantes de peciolo del medio inicial a un medio fresco conteniendo ambos (2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D), se indujo a la formación de callos en un promedio de 29.6 % para ambos genotipos. El genotipo Blanco presentó mayor predisposición genética a la generación de callos que el Masaya. Se obtuvo (YA) en ambos genotipos, el genotipo Blanco presentó formación de (YA) en 100 % de los medios estudiados y el Masaya en 85.71 %. El 6-BAP produjo mayor porcentaje de (YA) en comparación a la Kinetina, el 6-BAP (3 mgL<sup>-1</sup>) fue el mejor medio inductor de (YA) para ambos cultivares, en Masaya (85.71 %), y en Blanco (53.3 %) de los explantes sembrados. En la regeneración de plantas se encontró un efecto remanente de las citocininas utilizadas en la fase anterior, el cultivar Masaya presentó mayor formación de plantas.

**Palabras claves:** *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, callos, micropropagación, yemas adventicias, reguladores de crecimiento, quequisque, explante, auxina, citocinina, genotipo (Masaya y Blanco), Kinetina.

**Abreviaturas:** 2,4-D = 2,4-diclorofenoxiacético; 2,4,5-T = 2,4,5-triclorofenoxiacético; AIA = ácido  $\beta$ - indolacético ; ZR = zeatine riboside; 6-BAP = 6-bencil aminopurina; (YA) = yemas adventicias; ANA = ácido naftalenacético; MS = nutrientes básicos de Murashige y Skoog (1962)

## **I. Introducción**

El quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) pertenece a la familia *Araceae*; es originario de América; cultivado desde la época precolombina en Las Antillas, América Central y Sur (López *et al.* 1995, Blanco 1987, Dávila *et al.* 2000); y es considerado uno de los primeros cultivos domesticados por el hombre (López *et al.* 1995, MAG-FOR 2000). Recientemente, el quequisque y otras especies de *Xanthosoma* han ganado un valor excepcional como alimento debido a sus características organolépticas y nutritivas (López y Castillo 1996).

La mayor producción en Nicaragua se localiza en las zonas húmedas del país y está en manos fundamentalmente de pequeños y medianos productores de Nueva Guinea, El Rama y Río San Juan. Específicamente en el municipio de Nueva Guinea, se han instalado plantas acopiadoras y procesadores de cormelos de quequisque para la exportación. Empero, se cultiva también en el pacífico, en zonas como Masaya, Carazo, Granada y Rivas (MAG-FOR 2000).

Los productores de este rubro en la actualidad enfrentan una serie de problemas que limitan la producción y reducen su rentabilidad: suelos erosionados, número reducido de cultivares, condiciones no apropiadas para la siembra, falta de semilla de alta calidad, y además los daños causados por las enfermedades que atacan el cultivo; la cual, según el MAG-FOR (2000), la de mayor importancia económica y de difícil control es la enfermedad denominada Mancha Foliar o Lesión Foliar Marginal, causada por la bacteria *Xanthomona campestris* pv. *dieffenbachiae* (Pohronezny *et al.* 1990). Sin embargo, Rojas (1998) y Dávila *et al.* (2000) reportan al Mal Seco como una enfermedad de gran importancia en Centro América, Puerto Rico y África, la cual es causada entre otros agentes por *Sclerotium rolfsii*, función que es también compartida con otros hongos como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Pythium* sp. y algunas bacterias (Bejarano 1996).

La obtención de semilla botánica de quequisque resulta difícil por las características que presenta la flor, dado que sus óvulos están cubiertos por una sustancia gelatinosa y una ~~laxitud~~ ~~laxitud~~ que impiden la autofecundación; además existe una diferencia de 48 horas entre las ~~condiciones~~ ~~condiciones~~ óptimas para la receptibilidad del óvulo y la actividad del polen. Debido a esto su reproducción se realiza a través de su cormo, semilla asexual o vegetativa (López *et al.* 1995)

Las especies propagadas vegetativamente reproducen toda la información genética de la planta progenitora a la descendencia, es por esto que las características específicas de un individuo dado son perpetuadas y la población tiende a ser fenotípicamente muy uniforme (Hartman y Kester 1985), por lo que mejorar genéticamente los cultivares clonales a través de las técnicas convencionales de selección individual resulta difícil.

La propagación de plantas a través de la técnica de cultivos de tejidos presenta posibilidades para producir individuos con variaciones fenotípicas o genotípicas, denominada variación somaclonal; lo que ofrece una alternativa para el mejoramiento genético de cultivares existentes (Larkin y Scowcroft 1981, Evans 1989).

Las causas de variación pueden separarse en tres tipos: (1) aquellas causadas por la variación preexistente en la planta, (2) aquellas debido a variación genética, un cambio heredable en el ADN, producto de los procesos de desdiferenciación, rejuvenecimiento o rediferenciación, y (3) los cambios epigenéticos u efectos fisiológicos, caracterizada por ser cambios fenotípicos generados por genes que son estimulados y se expresan por los efectos del cultivo *in vitro per se*, pero estos genes no presentan cambios en el material hereditario; pero si pueden persistir en la descendencia a través de la propagación clonal (Berlyn *et al.* 1990, Bajaj 1991, Swartz 1991, Pérez Ponce 1998).

Los factores que provocan la variación somaclonal son: el genotipo, el tipo de explante, la duración de los cultivos *in vitro*, las condiciones de cultivos y la forma de regeneración o micropropagación (Pérez Ponce 1998).

La **variación somaclonal** tiene un gran potencial en el mejoramiento genético, debido a las **ventajas** que presenta: los cambios pueden ocurrir en caracteres de interés agronómico, **aumento** de la frecuencia de aparición de los cambios, **producción** de mutantes **nóveles**, **posibilidad** de recuperar las mutaciones existentes en los tejidos somáticos, los que no pueden ser obtenidos a través de otro tipo de tecnología (Lindsey y Jones 1989, Evans y Bravo1986).

La **posibilidad** para descubrir cultivares mejorados como resultado de la **variación somaclonal** en especies de frutas tropicales tiene gran potencial (Litz y Jaiswal 1991). Wakasa (1979) identificó variaciones de piña sin espinas en plantas originadas de cultivos de tejidos, Hwang y Ko (1987) en plantas de bananos con resistencia a *Fusarium oxysporum* F. sp. *cubense* raza 4.

Los procesos de embriogénesis somática indirecta, a partir de la formación de callos y la **organogénesis** a través de yemas adventicias, presentan posibilidades de inducir **variación somaclonal** en las plantas propagadas (Larkin y Scowcroft 1981, Debergh y Read 1991, George 1993).

La **producción** de yemas adventicias se da a través de la formación *de novo* de yemas a partir de una o un pequeño grupo de células meristemáticas preexistentes o tejidos no meristemáticos, cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de **citocininas** (Vuylsteke y De Langhe 1985) citado por Jiménez (1998). Las yemas **adventicias** se pueden obtener a partir de callos, denominada **inducción indirecta**; o **inducción directa** a partir de órganos como: peciolos, hojas, tallo, raíz, cotiledones, yemas **apicales** (George 1993). Esta técnica de micropropagación a partir de yemas adventicias ha sido exitosa en algunos frutales del trópico y subtropico en especies como: musaceas y piña (Litz y Jaiswal 1991).

La variabilidad es mayor en la medida que los individuos sean obtenidos a partir de tejido menos diferenciados. Es por esta razón que las plantas que se forman a través del proceso de embriogénesis somática de tejidos no diferenciados, callos; tienen poca estabilidad genética, generando individuos nóveles (Pérez Ponce 1998).

Puesto que el callo es un tejido coherente y amorfo, formado cuando las células de la planta se multiplican de manera desorganizada, los procesos de diferenciación y especialización celular que ocurren en el explante, producen un nuevo tejido el cual está compuesto de tipos de células meristemáticas y no especializadas (George 1993).

El tejido que conforma los callos no son de un solo tipo. Los grupos de callos difieren en apariencia, color, grado de compactación y potencial morfogénico. Esto puede depender del tipo de información genética que se active dentro de la célula (cambios epigénicos). Sin embargo es más probable que sea producto de explantes compuestos de más de un tipo de células (George 1993).

La formación de callos no diferenciados o células no organizadas son necesarias para el proceso de embriogénesis, que consiste en la formación *in vitro* de embriones a partir de células somáticas (George 1993).

Las yemas adventicias, por su parte, se distinguen de los embriones somáticos por que éstos últimos son bipolares, o sea que presentan un brote y un polo radicular, brotes axilares y cotiledones, y no presentan una conexión vascular con el tejido parental (George 1993).

Muchas especies cultivadas y forestales del trópico y subtropico han sido regeneradas a través de la embriogénesis somática: mango, banano, plátano, melocotón, palmera de dátiles, níspero y cítricos (Litz y Jaiswal 1991).

Con el presente trabajo de investigación se pretende cumplir con el siguiente objetivo:

- Determinar el efecto combinado de los reguladores de crecimiento, tipos de explantes y genotipos en la inducción de callos y micropropagación a partir de yemas adventicias en sus dos fases, inducción de yemas adventicias y generación de plantas; de dos genotipos de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott).

Hipótesis:

Ha: Las condiciones de cultivo *in vitro* estudiadas, inducen a importantes diferencias porcentuales entre los dos genotipos de quequisque, en cuanto a la formación de callos y micropropagación a partir de yemas adventicias, en sus fases de inducción de yemas adventicias y generación de plantas a partir de yemas adventicias.

Ho: Las condiciones de cultivo *in vitro* estudiadas, no inducen a importantes diferencias porcentuales entre los dos genotipos de quequisque, en cuanto a la formación de callos y micropropagación a partir de yemas adventicias, en sus fases de inducción de yemas adventicias y generación de plantas a partir de yemas adventicias.

## **II. Revisión bibliográfica**

### **2.1. Antecedentes del cultivo de tejidos en la inducción de callos en los géneros *Xanthosoma* y *Colocasia*.**

Son numerosos los estudios dirigidos a la obtención de plantas a través de la embriogénesis somática y organogénesis en estos géneros.

Diferentes investigadores citados en la Tabla 1, han incluido en sus estudios para la inducción de callos, factores como los tipos de explante; concentración y combinación de reguladores de crecimiento usados en los medios de cultivo.

Es probable que todos los tejidos vegetales tengan la capacidad para formar callos *in vitro*; pero pocos explantes tienen la habilidad para formar callos embriogénicos (Litz y Jarret 1991).

En la mayoría de las *Araceae* la embriogénesis somática y la regeneración de plantas pueden ser obtenidas a partir de tejidos embriogénicos (Dottin 2000). Usualmente se han usado como explante yemas apicales y axilares; así también pecíolos, lámina foliar y cormos (Irawati y Webb. 1983, Nyochemberg y Garton 1998, Dottin 2000).

Según Denchev *et al.* (1990) citado por Gómez (1998), la repuesta del explante a la embriogénesis está determinada por la edad de éste, así como la concentración de auxina empleada. Se ha establecido una fuerte correlación entre el estado de desarrollo del explante inicial y la concentración de auxina en el proceso de desdiferenciación y diferenciación.

Para la obtención de callos es necesario altas concentraciones de auxinas exógenas o cualquier tipo de auxina potente (Yam *et al.* 1990, Quintero 1993, Gómez 1998). El tipo de auxina y su concentración puede variar entre especies, incluso entre un mismo género (Dottin 2000).

Tabla 1. Tipos de explantes, medios de cultivo, reguladores de crecimiento utilizados en la inducción de callos en los géneros *Xanthosoma* y *Colocasia*.

Autor	Explante	Medio de cultivo	Regulador de crecimiento	Género
Gruta (1985)	Meristemos	AZ (1976)	ANA	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>
Yam <i>et al.</i> (1990)	Yemas axilares	MS (1962)	2,4,5-T + glutamina	<i>Colocasia</i>
Yam <i>et al.</i> (1990)	Yemas axilares	MS (1962)	6-BAP + ANA	<i>Colocasia</i>
Nyochemberg y Garton (1998)	Yemas apicales y pecíolos	Gambor (1968), MS (1962)	Dicamba & Thidiazurom.	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>
Nymaff <i>et al.</i> (1983)	Yemas apicales	Knop's (1979)	Dicamba + Kinetina	<i>Colocasia</i>
Irawati y Webb (1983)	Yemas apicales, pecíolos y lámina foliar	MS (1962)	2,4,5-T	<i>Colocasia</i>
Sabapathy y Nair (1995)	Yemas apicales	Linsmaier y Skoog (1965)	SD 8339	<i>Colocasia</i>
Dottin (2000)	Corno, pseudotallo (pecíolo) y ápice	MS (1962)	ANA + Kinetina + 2,4-D	<i>Xanthosoma</i>
Liu <i>et al.</i> (1988)	Yemas apicales	Gambor (1968)	Glicina + AIA + Kinetina + 2,4-D + ANA	<i>Xanthosoma</i>

En los géneros *Xanthosoma* y *Colocasia* se han utilizado como auxinas inductoras ANA, 2,4-D, Dicamba, Thidiazurom, 2,4,5-T, AIA. Entre las más efectivas están 2,4-D; 2,4,5-T y AIA usadas en rangos 1-3 mgL<sup>-1</sup>, 0.02-3 mgL<sup>-1</sup>, 1-5 mgL<sup>-1</sup> respectivamente.

## 2.2 Antecedentes del cultivo de tejidos en la inducción de yemas adventicias en *Xanthosoma*

En la Tabla 2 se resumen los factores que han sido estudiados por diferentes autores en la producción de yemas adventicias en el género *Xanthosoma*.

Todos los autores utilizan ápices como explantes para la formación de yemas adventicias. El empleo de altas concentraciones de citocininas como reguladores de crecimiento

favorece la formación de yemas adventicias (Gupta 1985, Litz y Jarret 1991, Ndoumou *et al.* 1995, Dottin 2000).

**Tabla 2.** Tipos de explantes, medios de cultivo y reguladores de crecimiento utilizados en la inducción de yemas adventicias en *Xanthosoma*.

Autor	Explante	Medio de cultivo	Regulador de crecimiento.	Género
Gupta (1985)	Yemas apicales	MS (1962)	ANA	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>
Strauss y Ardetti (1980)	Yemas apicales	Linsmaier y Skoog (1965)	SD 8339 + ANA	<i>Xanthosoma caracu</i>
Ndoumou <i>et al.</i> (1995)	Yemas apicales	MS (1962)	2,4-D + IBA + 6-BAP	<i>Xanthosoma sagittifolium</i>
Dottin (2000)	Yemas apicales	MS (1962)	6-BAP	<i>Xanthosoma</i>
Ndoumou <i>et al.</i> (1995)	Yemas apicales	MS (1962)	ANA + AIA + 6-BAP + Kinetina	<i>Xanthosoma</i>
Asokan <i>et al.</i> (1984)	Yemas apicales	MS (1962)	6-BAP + AIA	<i>Xanthosoma caracu</i>

Dottin (2000) citando a Bajaj (1991) explica que cuando se cultivan los explantes en medios con concentraciones elevadas de citocininas, las células de meristemas preexistentes o de tejido no meristemático del explante se diferencian, generalmente a partir de una célula o de un grupo pequeño de éstas, consecutivamente comienzan a dividirse formando nuevas yemas.

Usualmente en los meristemas y ápices, la concentración de citocinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citocininas en los medios de establecimiento es generalizada (Jiménez 1998). Por su parte Hu y Wang (1983) citado por Jiménez (1998) reportan que en el 85 % de los medios de establecimiento se utilizan citocininas, las más empleadas han sido el 6-BAP (68 %), la Kinetina (23 %), el 2IP y la Zeatina (9 %). El 6-BAP se utiliza en un rango de 0-3 mgL<sup>-1</sup> y la Kinetina de 0.1-2 mgL<sup>-1</sup>.

### **III. Materiales y métodos**

El estudio de inducción de callos y micropropagación a partir de yemas adventicias en sus dos fases en dos cultivares clonales de quequisque *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, se llevó a cabo en el laboratorio de cultivos de tejidos vegetales del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km. 12 ½ de la carretera norte, en el departamento de Managua. El estudio tuvo una duración de diecinueve meses, en un período comprendido entre enero del 2000 hasta agosto del 2001.

#### **3.1 Materiales y equipos**

Los materiales necesarios para la realización del estudio fueron: ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de potasio (KOH), alcohol, hipoclorito de sodio (NaOCl), reguladores de crecimiento (ANA; AIA; ZR; 2,4-D; 2,4,5-T, Kinetina y 6-BAP), nutrientes del medio básico de cultivo Murashige y Skoog (1962), sacarosa, agar, myo-inositol, papel de aluminio, cinta adhesiva, algodón, agua destilada y agua desionizada.

Los equipos y cristalería que se usaron para el estudio fueron: horno, marcadores, mecheros bunsen, pinzas, pipetas, placas petri, beakers, agitadores, autoclave, tubos de ensayo, estereoscopio, balanza analítica, escalpelos, cuchillos, cámara de flujo laminar, erlenmeyer, pHmetro y frascos.

#### **3.2 Medidas de asepsia**

Los utensilios como pinzas 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 antes de su uso, utilizando luz ultravioleta durante 15 minutos, posteriormente se dejó media hora sin presencia de luz ultra violeta, para iniciar la siembra *in vitro*.

Previo a la siembra, los medios de cultivo, platos petri, frascos y tubos de ensayos fueron esterilizados en el auto clave a 121 °C y a una atmósfera de presión, durante 20 minutos. El medio de cultivo esterilizado fue distribuido en los recipientes en que se diseñó el ensayo, en condiciones de cámara de flujo laminar.

### **3.3 Medio de cultivo**

El medio de cultivo se preparó con agua desionizada la que se depositó en un beaker, luego se le agregó según el orden las siguientes sustancias: nutrientes del medio básico de cultivo de Murashige y Skoog (1962) ( $4.41 \text{ gL}^{-1}$ ), azúcar ( $30 \text{ gL}^{-1}$ ), myo-inositol ( $0.1 \text{ gL}^{-1}$ ); se agitó por 5 minutos en un agitador magnético, para luego ser vertidos uniformemente en diferentes recipientes que correspondían a cada tratamiento en estudio.

Los medios de cultivo se agitaron para agregarles los distintos reguladores de crecimiento correspondientes a cada tratamiento, luego se reguló el pH a 5.8 y se le adicionó agar ( $3 \text{ gL}^{-1}$ ), se calentó hasta punto de ebullición.

### **3.4 Manejo del tejido**

En el trabajo de investigación se emplearon los cultivares clonales Blanco y Masaya de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott); Se colectó en el campo semilla agámica o cormos de los cultivares estudiados, se lavaron con agua y detergente. El tejido apical se obtuvo de los cormos para ser establecidos en medios de cultivo, generando plantas *in vitro*; las cuales se multiplicaron cada 30 días para poseer suficiente material vegetal de donde obtener explantes (ápices, peciolo y hojas) necesarios para montar los ensayos.

Los ápices utilizados en la inducción de callos y yemas adventicias se tomaron de las plantas *in vitro* establecidas con anterioridad, diseccionado el tejido apical a un tamaño de 5-7 mm<sup>2</sup> separándolo de las raíces, peciolo y tejidos del cormo. Los peciolo de color verde y consistentes se cortaron en fragmentos de 5-7 mm longitud, para utilizarse en la inducción de callos. De las hojas verdes bien desarrolladas se obtuvieron los explantes para el estudio, se diseccionaron en cuadros de 25 mm<sup>2</sup> aproximadamente, eliminando la nervadura central.

### **3.5 Estudios realizados**

Se establecieron una serie de experimentos para la inducción de callos y micropropagación a partir de yemas adventicias, como se detallan a continuación.

Se realizaron cuatro ensayos de inducción de callos (dos de ellos exploratorios), y uno para cada fase de la micropropagación a partir de yemas adventicias. Seis ensayos en total.

#### **3.5.1 Ensayos de inducción de callos**

Para la inducción de callos se realizaron cuatro ensayos; uno a partir de explantes de hojas, otro, a partir de explantes de ápices y peciolo; y dos exploratorios. Esta diferencia en el diseño fue establecida basándonos en los estudios realizados por distintos autores quienes definen que los resultados dependen de la naturaleza del explante en combinación con medios de cultivo, los que varían en tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento.

##### **3.5.1.1 Inducción de callos a partir de explantes de hojas**

En este estudio se evaluaron dos genotipos y 28 medios de cultivo (descritos en la Tabla 4), 56 tratamientos en total, con 15 tubos-réplica por tratamiento; en condiciones de oscuridad total y a temperatura de  $26 \pm 2$  °C.

Tabla 3. Factores estudiados en el ensayo de inducción de callos a partir de explantes de hojas de quequisque

Genotipo	Tipo de explante	Auxina	Citocinina
Masaya	Hoja	ANA	6-BAP
Blanco		2,4-D	
		2,4,5-T	

Tabla 4. Medios de cultivo empleados en el ensayo de inducción de callos a partir de explantes de hojas en los genotipos de quequisque Blanco y Masaya

6-BAP (mgL <sup>-1</sup> )	Auxina (mgL <sup>-1</sup> )	
0	0	Testigo
0		
1	1	
3		
0		
1	3	ANA
3		
0		
1	5	
3		
0		
1	1	
3		
0		
1	3	2,4-D
3		
0		
1	5	
3		
0		
1	1	
3		
0		
1	3	2,4,5-T
3		
0		
1	5	
3		

\* Medio básico MS (1962)

### 3.5.1.2 Inducción de callos a partir de explantes de ápices y peciolo

En este ensayo se evaluaron dos tipos de explantes de dos genotipos, y 19 variantes de medios de cultivo (descritos en la Tabla 5), para un total de 76 tratamientos, 15 tubos-réplica por tratamiento. Las condiciones utilizadas fueron de 12 horas luz natural y oscuridad, y a temperatura de  $26 \pm 2$  °C.

Tabla 5. Factores estudiados en el ensayo de inducción de callos a partir de explantes de ápices y peciolo de quequisque

Genotipo	Tipo de explante	Auxina	Citocinina
Masaya	Apice	AIA	Kinetina
Blanco	Peciolo	2,4-D	

Tabla 6. Medios de cultivo empleados en el ensayo de inducción de callos a partir de explantes de ápices y peciolo de quequisque

Auxina (mgL <sup>-1</sup> )		Kinetina (mgL <sup>-1</sup> )
0	Testigo	0
1	AIA	0
1		1
1		3
3		0
3		1
3		3
5		0
5		1
5		3
1		2,4-D
1	1	
1	3	
3	0	
3	1	
3	3	
5	0	
5	1	
5	3	

\* Medio básico MS (1962)

### 3.5.1.3 Estudios exploratorios de inducción de callos

Este estudio se planteó a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de inducción de callos a partir de hojas y peciolo; buscando la posibilidad de optimizar la metodología en la inducción a callos a través del uso de medio fresco y el cultivo de meristemas como estimulantes de la producción de callos.

#### 3.5.1.3.1 Efecto del uso del medio fresco como inductor de callos.

En este estudio se utilizaron dos tipos de explantes, dos genotipos de quequisque en dos variantes de secuencia de cultivo (descritos en la Tabla 8), para evaluar 8 tratamientos en total, cada uno con réplicas de 4 platos petri, con 4 explantes por plato; condiciones de 12 horas luz natural y oscuridad, temperatura de  $26 \pm 2$  °C.

Tabla 7. Factores estudiados en el ensayo del efecto del uso del medio fresco como inductor de callos.

Genotipo	Tipo de explante	Secuencia de cultivo
Masaya	Hoja	SC 1
Blanco	Peciolo	SC 2

Tabla 8. Secuencias de cultivo empleadas en el ensayo del efecto del uso del medio fresco como inductor de callos a partir de hojas y peciolo en los genotipos de quequisque Blanco y Masaya.

Secuencia de cultivo	Medio inicial	Medio fresco
SC 1	2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> )	2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> )
SC 2	2,4-D (2 mgL <sup>-1</sup> )	Z R (0.8 mgL <sup>-1</sup> )

\*Medio básico MS (1962)

\* SC = Secuencia de cultivo. Los explantes se establecieron en un medio inicial, a los 30 días se transfirieron a un medio fresco donde permanecieron 30 días más.

#### 3.5.1.3.2 Uso del cultivo de meristemas en la inducción de callos

Se utilizó el estereoscopio para poder extraer, diferenciar y diseccionar los meristemas a un tamaño aproximado de 0.2 mm de diámetro. Se establecieron 4 meristemas por plato petri, de cada genotipo, en las 3 variantes de medio (descritos en la Tabla 10), 6 tratamientos en total, cada uno con una repetición de 4 platos; las condiciones utilizadas fueron de 12 horas luz natural y oscuridad, a una temperatura de  $26 \pm 2$  °C.

Tabla 9. Factores estudiados en el ensayo del uso del cultivo de meristemos en la inducción de callos

Genotipo	Reguladores de crecimiento
Masaya	2,4-D
Blanco	6-BAP
	ANA

Tabla 10. Medios de cultivo empleados en el ensayo del uso del cultivo de meristemos en la inducción de callos en los genotipos de quequisque Blanco y Masaya.

Medio	Reguladores de crecimiento	
1	2,4-D	3 mgL <sup>-1</sup>
2	6-BAP	2 mgL <sup>-1</sup>
3	ANA	0.7 mgL <sup>-1</sup>

\*Medio básico MS (1962)

### 3.5.2 Micropropagación a través de yemas adventicias.

#### 3.5.2.1 Inducción de yemas adventicias a partir de ápices de quequisque

El ensayo de inducción de yemas adventicias, se estableció en 7 variantes de medios de cultivo (descritos en la Tabla 12), para los dos genotipos de quequisque, evaluándose 14 tratamientos, con 15 tubos-réplica por tratamiento; condiciones de 12 horas luz natural y a temperatura de  $26 \pm 2$  °C.

Tabla 11. Factores estudiados en el ensayo de inducción de yemas adventicias a partir de explantes de ápices de quequisque

Genotipo	Tipo de explante	Auxina	Citocinina
Masaya	Apice	AIA	Kinetina
Blanco			6-BAP

Tabla 12. Medios de cultivo empleados en la inducción de yemas adventicias a partir de explantes de ápices en los genotipos de quequisque Blanco y Masaya, más 1 mgL<sup>-1</sup> de AIA

Citocinina (mgL <sup>-1</sup> )	
0	Testigo
3	Kinetina
5	
10	
3	6-BAP
5	
10	

\* Medio básico MS (1962)

### 3.5.2.2 Generación de plantas a partir de yemas adventicias

Para la producción de plantas *in vitro* se diseccionaron las yemas adventicias producidas en el ensayo de inducción de yemas adventicias en dos genotipos de quequisque, sembrando 4 yemas por frasco, 5 frascos por tratamiento, cada frasco contenía 30 ml de medio de cultivo.

El medio de cultivo para la producción de plantas *in vitro* se preparó con los siguientes componentes: nutrientes del medio básico de cultivo de Murashige y Skoog (1962) (4.41 gL<sup>-1</sup>), azúcar ( 30 gL<sup>-1</sup>), myo-inositol ( 0.1 gL<sup>-1</sup>), agar (3 gL<sup>-1</sup>), AIA (1.5 mgL<sup>-1</sup>), 6-BAP (0.5 mgL<sup>-1</sup>) y a un pH de 5.8.

### 3.6 Variables evaluadas y análisis de datos

La evaluación de los estudios de inducción a callos y micropropagación a partir de yemas adventicias se realizó a los 30 días después de establecidos. Para valorar los datos no paramétricos en los ensayos de inducción a callos a partir de hojas, peciolo y ápices, se elaboraron las siguientes escalas; escala de formación en la inducción a callos y la escala de coloración de explantes. En el estudio exploratorio las variables evaluadas fueron la formación o no de callos.

Escala de formación en la inducción a callos:

- 1) Formación de plantas
- 2) Formación de raíces
- 3) Formación de plantas con raíces
- 4) Formación de multibrotos
- 5) Formación de callos
- 6) Explantes necrosados

Escala de coloración de explantes:

- 7) Explantes verdes
- 8) Explantes amarillo

En el estudio de micropropagación a partir de yemas adventicias, en las fases de inducción de yemas adventicias y producción de plantas *in vitro*, la evaluación de los datos se realizó según la siguiente escala:

- 9) Formación de plantas
- 10) Formación de plantas con hijos
- 11) Formación de yemas adventicias grandes
- 12) Formación de yemas adventicias pequeñas
- 13) Explantes necrosados
- 14) Explantes sin crecimiento

Los datos no paramétricos se representaron gráficamente como resultado del cálculo de los porcentajes de las frecuencias de las observaciones evaluadas en los estudios de inducción de callo a partir de hojas, peciolo, ápices y en los ensayos exploratorios (efecto del medio fresco como inductor a callos y el cultivo de meristemos en la inducción a callos); y micropropagación a partir de yemas adventicias en las fases de inducción de yemas adventicias y generación de plantas *in vitro* a partir de yemas adventicias.

## **IV. Resultados y Discusión**

Las auxinas participan ampliamente en la organización de los procesos vegetales, la regulación de las proporciones de crecimiento diferencial y de fenómenos de diferenciación (formación de distintos órganos a través de la organogénesis) (George 1993), los que son estimulados e inhibidos según la concentración auxínica presente en la célula o estructura vegetal (Barba 1994).

El cultivo *in vitro* requiere de la adición de auxina al medio para la inducción y la proliferación de callos, teniendo en cuenta que para su producción está íntimamente relacionado la concentración, tipo de explante y el balance auxina-citocinina empleada (Barba 1994).

### **4.1 Resultados y discusión de inducción de callos**

Los resultados de los ensayos de inducción de callos variaron en dependencia a la combinación de reguladores de crecimiento, tipo de explante y genotipo. El tipo de explante fue el factor más determinante en la formación de callos, por esta razón los resultados se presentan en función al tipo de explante.

#### **4.1.1 Inducción de callos a partir de hojas**

Ninguno de los medios de cultivo estudiados, indujo a la producción de callos a partir de hojas en ambos cultivares (Figura 1). Sin embargo, se observó diferencias entre los genotipos ante el efecto de las combinaciones de AIA y 2,4-D con 6-BAP, a favor del cultivar Masaya, al mostrar persistencia del color verde en los explantes; en cambio, solo el cultivar Blanco presentó explantes necrosados.

Por otra parte, ambos cultivares tuvieron un comportamiento similar ante el efecto del 2,4,5-T al presentar altos porcentajes de explantes amarillos, lo que sería una antesala al necrosamiento o muerte del explante. Gómez (1998), Yam *et al.* (1990 y 1991) y Nyman *et al.* (1983) consideran que el 2,4,5-T es una auxina potente, dado que tiene mayor efecto que

el ANA y ALA en similares o a un en menores concentraciones; esto podría deberse a que las auxinas sintéticas tienen menos sistemas enzimáticos que las degraden o inactiven (Barba 1994).

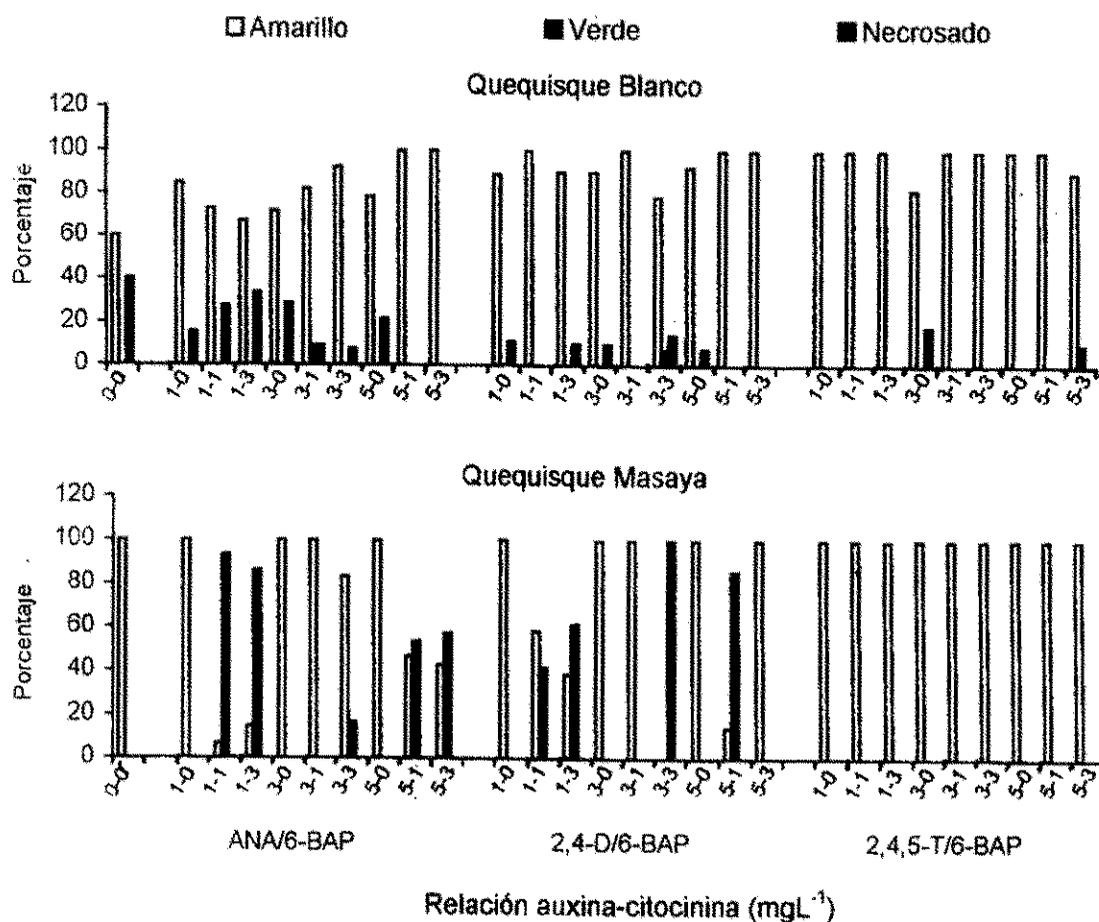


Figura 1. Porcentaje de explantes de hojas verdes, amarillas y necrosados, como resultado del efecto de las combinaciones de ANA, 2,4-D y 2,4,5-T (1, 3 y 5 mgL<sup>-1</sup>) con 6-BAP (0, 1 y 3 mgL<sup>-1</sup>) en dos cultivares de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)

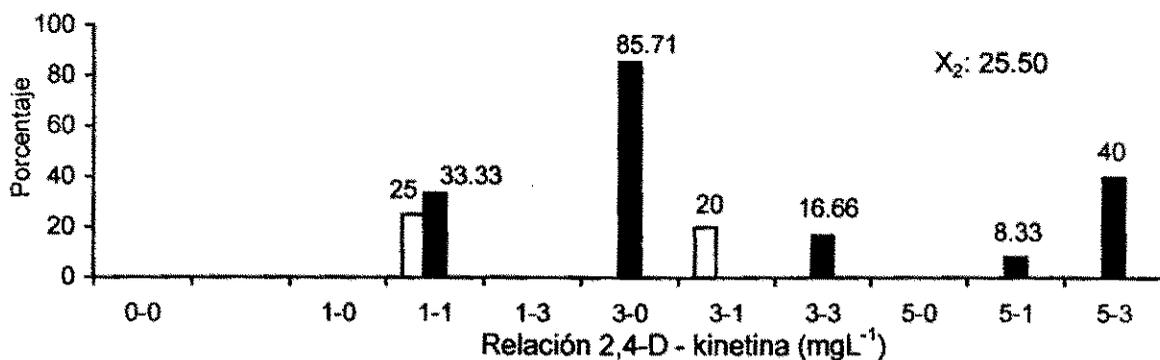
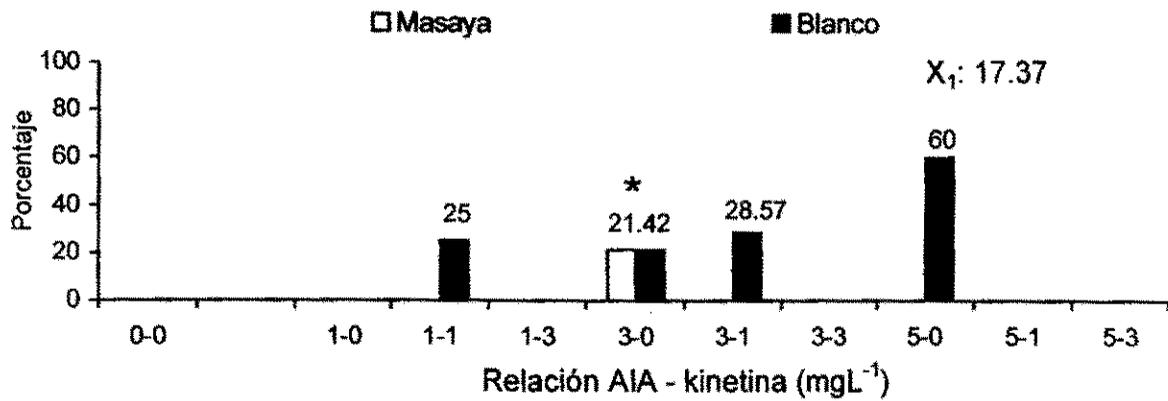
#### **4.1.2 Inducción de callos a partir de ápices.**

Los genotipos Masaya y Blanco produjeron callos a partir de explantes de ápices en medios de cultivo que contenían AIA y 2,4-D como auxina inductora, registrándose mayor porcentaje de callos en el genotipo Blanco (Figura 2).

Existe una diferencia genotípica ante el efecto de las hormonas; en el cultivar Masaya se indujo a callos en los medios que contenían AIA (3:0 mgL<sup>-1</sup>) y 2,4-D (1:1, 3:1 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con Kinetina, y en el clon Blanco, en los medios de AIA (1:1, 3:0, 3:1 y 5:0 mgL<sup>-1</sup>) y 2,4-D (1:1, 3:0, 3:3, 5:1 y 5:3 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con Kinetina.

El medio que presentó mayor porcentaje de formación de callos para el genotipo Masaya fue 2,4-D en combinación con Kinetina (1:1 mgL<sup>-1</sup>) en 25 % de los explantes sembrados, y con AIA (3mgL<sup>-1</sup>) en 21.42 % sin Kinetina (Anexo III), los callos producidos en este medio de cultivo presentaron raíces, brotes y plantas. Por otra parte, en el genotipo Blanco el medio de cultivo que indujo a callos fue el AIA en concentración de (5 mgL<sup>-1</sup>) en 60 % y usando 2,4-D (3 mgL<sup>-1</sup>) con 85.71 %, en ausencia de Kinetina. El 2,4-D como regulador de crecimiento indujo a la formación de callos en 25.5 % de los explantes de ambos genotipos, y el AIA en 17.37 %.

El AIA como hormona tuvo un efecto inductor a la morfogénesis (formación de plantas, raíces y brotes) en los explantes de ambos genotipos. El 2,4-D en comparación con el AIA fue más tóxico casi en todas las combinaciones utilizadas, al presentar gran cantidad de explantes necrosados, siendo el genotipo Masaya más susceptible, mostrando mayor porcentaje de necrosamiento.



\* Medio de cultivo que produjo callos con raíces, brotes y plantas en el cultivar Masaya  
 - X<sub>1</sub>; X<sub>2</sub>: Promedio de explantes que produjeron callos en los medios con AIA y 2,4-D como inductores, respectivamente.

Figura 2. Porcentaje de callos inducidos a partir de ápices de plantas *in vitro* en dos cultivares de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.)Schott) estudiados en medio MS (1962) a diferentes niveles de AIA y 2,4-D (1, 3 y 5 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con kinetina (0, 1 y 3 mgL<sup>-1</sup>) en la inducción de callos.

#### 4.1.3 Inducción de callos a partir de peciolo.

En la inducción a callos a partir de peciolo se observó una diferencia en el comportamiento de los dos genotipos al producirse callos únicamente en el cultivar Masaya (Figura 3). El medio de cultivo inductor fue el que contenía (1:1) mgL<sup>-1</sup> 2,4-D con Kinetina,

generando callos en un 14 % de los explantes; siendo estos blanco, nodulares y consistentes (Anexo IV).

Los explantes de ambos genotipos presentaron persistencia similar al color verde, sin embargo el 2,4-D tuvo mayor efecto sobre el necrosamiento del tejido que el AIA, aunque las combinaciones de AIA y 2,4-D con Kinetina en concentraciones de (3:1, 3:3, 5:0) mg L<sup>-1</sup> mostraron mayor porcentaje de explantes necrosados.

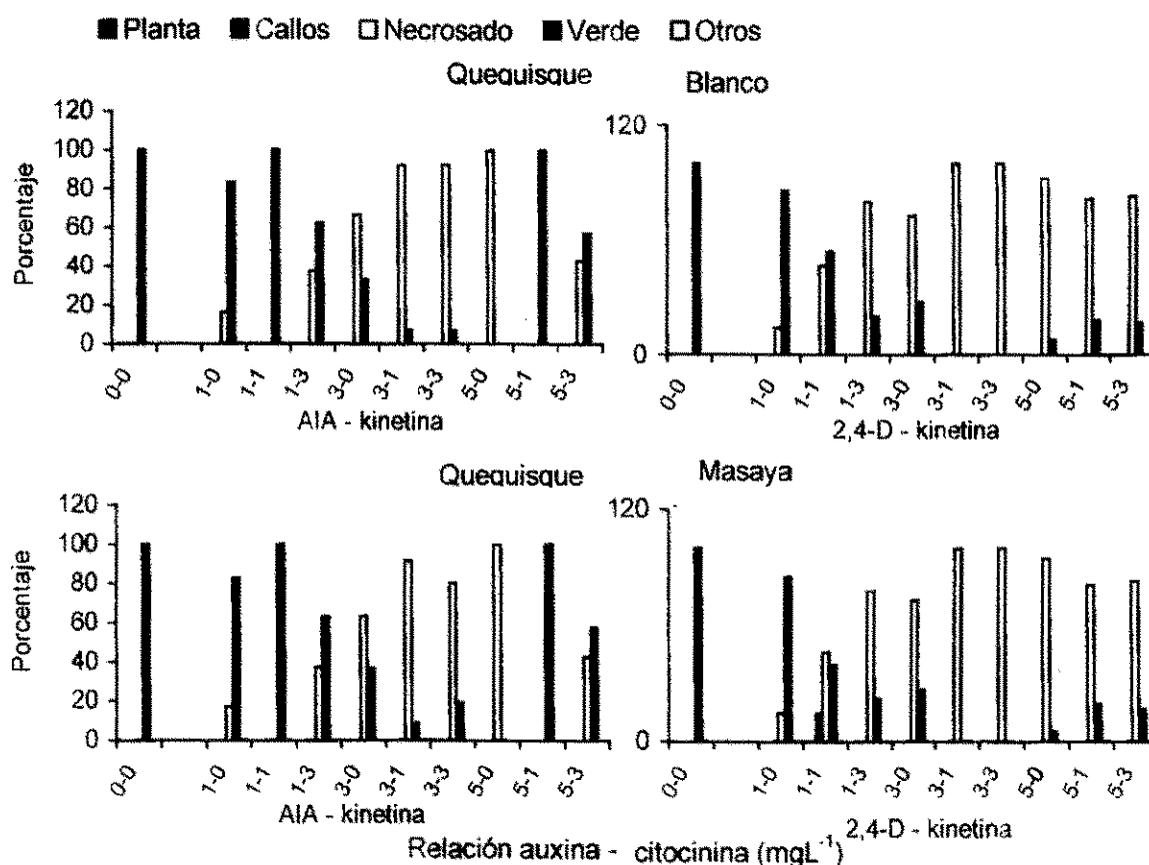


Figura 3. Porcentaje de callos inducidos a partir de peciolo de plantas *in vitro* en dos cultivares de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) cultivados en medios MS (1962) a diferentes niveles de AIA y 2,4-D (1, 3 y 5 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con kinetina (0, 1 y 3 mgL<sup>-1</sup>).

#### 4.1.4 Estudio exploratorio en la inducción de callos

##### Efecto del medio fresco como inductor de callos a partir de hojas y peciolo

El uso de medio fresco no estimuló la producción de callos en el tejido de hojas (Tabla 13), sin embargo, a partir de peciolo fue posible la obtención de callos con el uso de 2,4-D (2 mg L<sup>-1</sup>) como medio inicial y medio fresco, en (44.9 %) de los explantes sembrados del genotipo Blanco y en (14.3 %) Masaya; esto indica que existe una mayor predisposición a la formación de callos en el cultivar Blanco.

Tabla 13. Porcentaje de callos obtenidos en el ensayo del uso de medio fresco MS (1962) + 2,4-D (2 mgL<sup>-1</sup>) y Zeatine riboside (0.8 mgL<sup>-1</sup>) a partir de explantes de hojas y peciolo de plantas *in vitro* de dos cultivares de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott).

Secuencia de cultivo	Explantes			
	Hojas		Peciolo	
	Masaya	Blanco	Masaya	Blanco
2,4-D → 2,4-D	0	0	14.3	44.9
2,4-D → ZR	0	0	0	0

##### Uso del cultivo de meristemos en la inducción de callos

Según los resultados observados en la Tabla 14, ambos genotipos produjeron callos a partir del cultivo de meristemos; siendo los explantes de Blanco los que produjeron callos en un mayor porcentaje (58.3 %) en comparación a Masaya (33.33 %).

Tabla 14. Porcentaje de callos obtenidos en el ensayo del efecto del cultivo de meristemos de dos cultivares de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) en tres medios de MS (1962).

Genotipo	Medios de cultivo			Promedio
	2,4-D (3 mgL <sup>-1</sup> )	6-BAP (2 mgL <sup>-1</sup> )	ANA (0.7 mgL <sup>-1</sup> )	
Masaya	0	75	25	33.33
Blanco	75	50	50	58.33
Promedio	37.5	62.5	37.5	-

En el cultivar Blanco el medio que indujo mayor producción de callos fue el que contenía 2,4-D (3 mgL<sup>-1</sup>), por otra parte no se registró una diferencia porcentual entre los substratos que contenían 6-BAP (2 mgL<sup>-1</sup>) y ANA (0.7 mgL<sup>-1</sup>). El genotipo Masaya produjo callos a partir de meristemos en los medios que contenían 6-BAP y ANA, siendo el 6-BAP la hormona que produjo mayor número de callos. El 2,4-D (3 mgL<sup>-1</sup>) no provocó ningún efecto en la obtención de callos. El mejor medio para la inducción de callos a partir de meristemos fue el que contenía 6-BAP (2 mgL<sup>-1</sup>), generando un promedio de 62.5 % de el total de los callos obtenidos de este tipo de tejido, en ambos genotipos.

#### 4.1.5 Discusión de inducción de callos

Según los resultados obtenidos en los dos cultivares estudiados de *Xanthosoma sagittifolium*, es posible inducir a la formación de callos, en algunas de las condiciones de cultivo evaluadas (genotipo, tipo de explantes, medios de cultivo).

Se logró obtener callos a partir de ápices, peciolas y meristemos en ambos genotipos, siendo considerablemente mayor a partir de ápices. En esto se coincide con Irawati y Webb (1983) en *Colocasia esculenta*, y Dottin (2000) en *Xanthosoma*; sin embargo, Nyochembeng y Garton (1998) en *Xanthosoma* mencionan que la producción de callos fue significativamente mayor en peciolas que en ápices.

Los ensayos donde se utilizó hojas como explantes no produjeron callos, lo que coincide con Irawati y Webb (1983) que después de 4 semanas de cultivo no se observaron signos visibles de producción de callos. Trabajos reportados en *Colocasia esculenta* por Irawati y Webb (1983), y en *Xanthosoma*, por Nyochembeng y Garton (1998), Litz y Jarret (1991), George (1993), Debergh y Read (1991) plantean que los resultados en la inducción de callos en una misma especie suele estar relacionada al tipo de explantes utilizado; lo que coincide con lo demostrado en esta investigación, que no todos los tipos de explantes de una misma especie producen callos.

La inducción a callos también fue influenciada por el genotipo, al presentar el cultivar Blanco mayor predisposición genética a la formación de tejido no organizado, independientemente del tipo de explante y el medio de cultivo. Irawati y Webb (1983) reportan diferencias en la capacidad de generación de callos en los seis cultivares que estudiaron; Dottin (2000) considera que el efecto del regulador de crecimiento y la dosis empleadas depende mucho del genotipo con que se trabaje.

El uso de la técnica del cultivo en medio fresco aumentó la posibilidad en ambos genotipos de producir callos a partir de peciolos, no así en explantes de hojas.

Los callos producidos en ambos genotipos se caracterizaron por ser nodulares, consistentes y de coloración blanco amarillento (Anexo VII), esto coincide con Irawati y Webb (1983), Yam *et al.* (1990) Yam *et al.* (1991) y Dottin (2000), este último considera estos tipos de callos con estructuras embriogénicas. Sin embargo los callos inducidos en el genotipo Masaya a partir de ápices con el medio  $3 \text{ mgL}^{-1}$  AIA, en ausencia de citocinina, presentaron formación de raíces, plantas y brotes. Irawati y Webb (1983) consideran que esta última clase de callos son organogénicos y no es necesario subcultivarlos para generar plantas.

Según Nguyen y Nguyen (1987), los callos obtenidos a partir del cultivo de meristemos al ser transferidos a un medio libre de hormona presentan la posibilidad de generar plantas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la inducción de callos a partir de peciolos y ápices; el 2,4-D es la mejor auxina promotora de callos, datos que coinciden Ndoumou *et al.* (1995) al encontrar que el 70 % de los explantes sembrados en un medio que contenía 2,4-D produjeron callos, teniendo un efecto superior en comparación a otras auxinas; Irawati y Webb (1983) al comparar el ANA y 2,4-D como inductor de callos, encontraron que el 2,4-D fue el mejor impulsor a la formación de callos. Dottin (2000) plantea que algunos autores utilizan el 2,4-D en diferentes concentraciones para la formación de callos, esta respuesta variada entre los genotipos, hace necesario que se requiera desarrollar la tecnología adecuada para cada especie a trabajar.

El 2,4-D es usado en altas concentraciones para la iniciación de callos, debido a que suprime la morfogénesis y dando por resultado la rápida proliferación de células no diferenciadas, siendo también necesaria en menor concentración para mantener su crecimiento (Barba Álvarez 1994).

## **4.2 Resultados y discusión de el estudio de micropropagación a partir de yemas adventicias**

Los genotipos se comportaron de manera distinta en cada fase de el estudio de micropropagación a partir de yemas adventicias , por esta causa los resultados se presentan siguiendo el esquema de la micropropagación.

### **4.2.1 Inducción de yemas adventicias**

Ambos genotipos tienen la capacidad para producir yemas adventicias (Figura 4); en el genotipo Blanco se observó la formación de yemas adventicias en 7 de los 7 medios de cultivo, a diferencia del Masaya, en 6 de los 7 medios estudiados.

Los medios de cultivo que contienen 6-BAP indujeron yemas adventicias en mayor porcentaje en el genotipo Masaya (84.44 %) y (65.70 %) en el genotipo Blanco, que en los medios en que se usó la Kinetina como hormona inductora (Anexo V y VII) .

El mejor medio de cultivo para la inducción de yemas adventicias en ambos genotipos fue el medio suplementado con 6-BAP ( $3 \text{ mgL}^{-1}$ ), produciendo en Masaya 92.85 % y Blanco 73.33 % de los explantes sembrados.

Los dos cultivares presentaron resultados similares a la inducción a yemas adventicias ante el efecto del 6-BAP. En el medio MS +  $10 \text{ mgL}^{-1}$  6-BAP, las yemas adventicias producidas fueron pequeñas; sin embargo al disminuir la concentración de 6-BAP ( $3$  y  $5 \text{ mgL}^{-1}$ ) el tamaño de las yemas adventicias obtenidas aumentó.

La Kinetina indujo mayor cantidad de plantas en un mayor número de medios que el 6-BAP, en ambos genotipos. Sin embargo el medio que generó plantas en ambos genotipos fue 1 mgL<sup>-1</sup> de AIA en ausencia de citocinina. Unicamente el medio con 10 mgL<sup>-1</sup> de Kinetina + 1 mgL<sup>-1</sup> de AIA indujo al necrosamiento de los explantes en ambos genotipos; lo que indica que la Kinetina en esta concentración es tóxica para el cultivo.

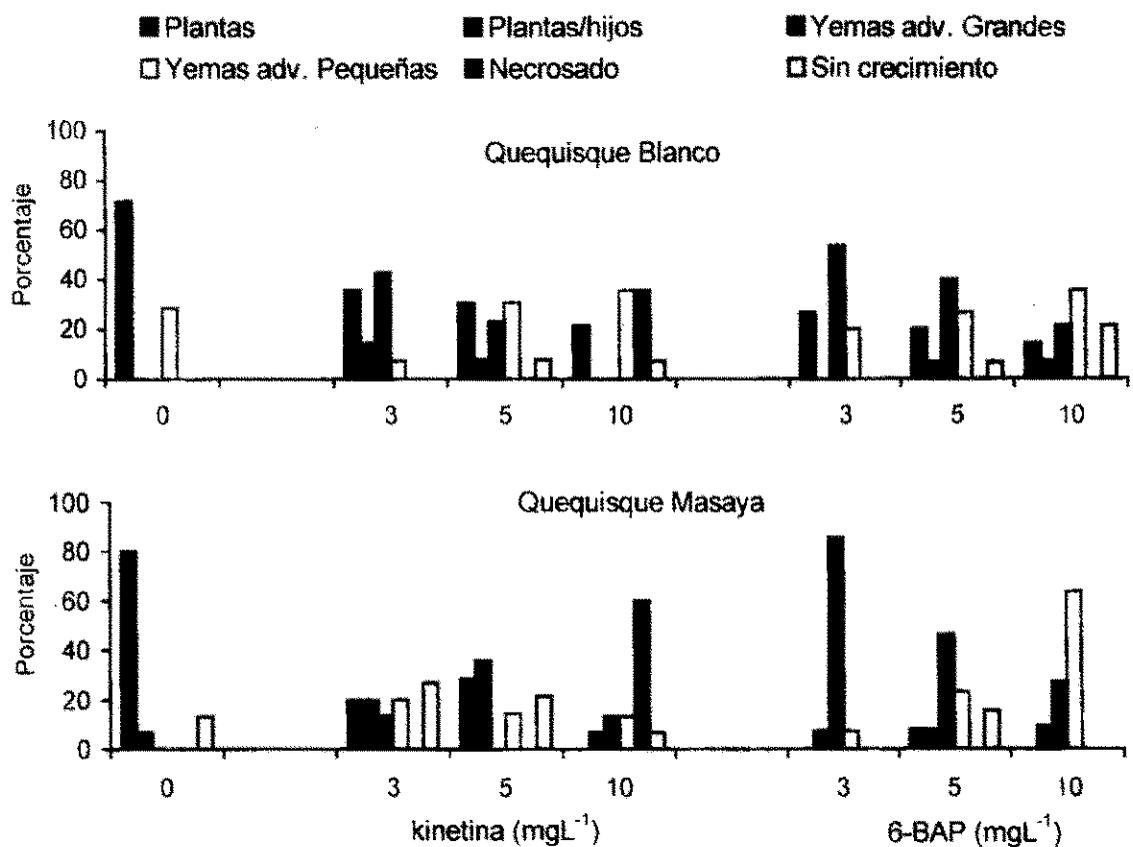


Figura 4. Efecto de tres niveles de Kinetina y 6-BAP (3, 5, 10 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con AIA (1 mgL<sup>-1</sup>) en la inducción de yemas adventicias a partir de explantes de ápices de plantas *in vitro* en dos cultivares de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott).

#### 4.2.2 Generación de plantas *in vitro* a partir de yemas adventicias

El medio que contenía 1.5 mgL<sup>-1</sup> de AIA y 0.5 mgL<sup>-1</sup> de 6-BAP, generó plantas en ambos genotipos; el cultivar Masaya presentó mayor predisposición genética a la formación de plantas, como se muestra en la siguiente Tabla.

Tabla 15. Porcentaje de plantas *in vitro* generadas a partir de yemas adventicias utilizando el medio (MS (1962)+ AIA 1.5 mgL<sup>-1</sup> + 6-BAP 0.5 mgL<sup>-1</sup>)

Genotipo	Medios Procedentes Citocinina + AIA (1 mgL <sup>-1</sup> )	Planta	Planta con hijo	Y A grandes	Y A pequeñas
	0	100	-	-	-
Masaya	3	59.99	9.99	23.33	6.66
	5 Kinetina	73.68	26.31	-	-
	10	63.33	9.99	-	26.66
	Promedio	65.66	15.43	7.77	11.10
	3	80	3.34	6.66	10
	5 6-BAP	57.14	21.42	17.85	3.57
	10	33.34	-	46.66	20
	Promedio	56.82	8.25	23.72	11.19
Promedio total		66.78	10.15	13.5	9.55
	0	100	-	-	-
Blanco	3	79.16	4.16	-	16.66
	5 Kinetina	84	4	12	
	10	33.34	8.34	16.66	41.66
	Promedio	65.5	5.5	9.55	19.44
	3	47.36	-	26.31	26.31
	5 6-BAP	21.43	21.43	35.70	21.42
	10	84.37	6.25	3.12	6.25
	Promedio	51.05	9.22	21.71	17.99
Promedio total		64.23	6.31	13.39	16.04

YA = Yemas adventicias

Las yemas adventicias obtenidas en medios que contenían Kinetina, generaron un mayor número de plantas en ambos genotipos, en comparación a los explantes que provenían de medios con 6-BAP, la formación de plantas fue menor al persistir el efecto de esta citocinina a inducir yemas adventicias.

### **4.2.3 Discusión del estudio de micropropagación a partir de yemas adventicias**

Según los resultados obtenidos, el genotipo Blanco presenta un mayor potencial para la inducción de yemas adventicias, sin embargo el cultivar Masaya genéticamente tiene mayor capacidad morfogénica al presentar más plantas.

En ambos estudios se observó que la Kinetina es la mejor citocinina para la producción de plantas y el 6-BAP para la inducción de yemas adventicias, resultados que concuerdan con Ndoumou *et al.* (1995) quienes realizaron un estudio comparativo del efecto del 6-BAP y Kinetina en *Xanthosoma sagittifolium*, concluyendo que las dos citocininas son capaces de generar plantas y yemas adventicias. La respuesta persistente de ambas citocininas a los ensayos expuestos, se puede deber al uso, en el medio para producción de plantas de la misma hormona (6-BAP) utilizada en la inducción de yemas adventicias, o lo expresado por García y Acuña (2000) que existe un efecto remanente de los reguladores de crecimiento en las células de los tejidos sometidos a condiciones de cultivo *in vitro*.

## **V. Conclusiones**

### **5.1 Inducción de callos**

- Fue posible obtener callos a partir de explantes de ápices, peciolo y meristemos, excepto en los explantes de hojas
- Cuando se utilizan ápices como explantes hay mayor potencial para la formación de callos
- Existe mayor predisposición del genotipo Blanco a la generación de callos, independientemente a la auxina inductora y tipo de explante
- Todos los callos obtenidos presentaron las siguientes características: blanco amarillento, nodulares y consistentes
- El 2,4-D indujo la mayor producción de callos en ambos genotipos y en los diferentes tipos de explante
- El uso de medio fresco en secuencia aumenta la posibilidad de obtener callos a partir de peciolo

### **5.2 Micropropagación a partir de yemas adventicias**

- Las yemas adventicias fueron inducidas en ambos genotipos, en mayor porcentaje en el genotipo Blanco
- El 6-BAP indujo mayor formación de yemas adventicias en ambos genotipos

Fue mayor la generación de plantas a partir de yemas adventicias en el cultivar Masaya, sugiriendo una respuesta dada por el genotipo

Se observó un efecto remanente de las citocininas que inducen a yemas adventicias, una vez que los explantes fueron establecidos en medios para la generación de plantas

## **VI. Recomendaciones**

- Considerando que en Nicaragua existen más de dos variedades de quequisque se recomienda realizar investigaciones donde se estudien estos genotipos en condiciones de cultivo propuesta en el presente trabajo
- Desarrollar los estudios de micropropagación con el objetivo de evaluar la variación somaclonal de las plantas *in vitro* en la fase de viveros y campo
- Establecer estudios de embriogénesis y morfogénesis a partir de callos

## VII Bibliografía

- Asokan, MP; O'Hair, SK; Litz, RE. 1984. Rapid multiplication of *Xanthosoma caracu* by *in vitro* shoot tip culture. HortScience 19 (6): 885-886.
- Bajaj, Y. 1991. Biotechnology in agriculture and forestry 17. Spring Vrlog, 32-45: 127-140.
- Barba Álvarez, A. 1994. Cultivos de tejidos vegetales: cultivo de callos. Eds. DV Hurtado; ME Merino M. DF, México. Trillas. p. 93-100.
- Bejarano, MCA. 1996. Microflora asociada a las raíces, rizoplano y rizosfera de variedades de yautia (*Xanthosoma* sp.) afectadas por la enfermedad del mal seco: Identificación, función y control. Tesis M.Sc. Universidad de Puerto Rico, Mayaguez. PR. 149 p.
- Berlyn, GP; Anorvo, AO; Beck, RC. 1990. Optical techniques to measure genetic instability in cell and tissue cultures: Biotechnology in Agriculture and forestry 2:202-223.
- Blanco, M. 1987. Raíces y tubérculos. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias (ISCA). Managua, Nicaragua. 112 p.
- Cisne Contreras, JD. 1988. Introducción a la técnica de cultivo de tejidos vegetales. Tesis Ing. Agr. Managua, Nicaragua. IISCA. p. 92.
- Dávila Villegas, M; Varela Torres, D; Saavedra M, D. 2000. Cultivo del quequisque. Eds. H Obregón O. Managua, Nicaragua. INTA. 23 p. (Guía Tecnológica 24).

- Debergh, PC; Read PE. 1991. Micropropagation technology and application: Micropropagation. Eds. PC Debergh; RH Zimmerman. Netherlands. Kluwer Academic. p. 95-122.
- Dottin, MP. 2000. Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Tesis de doctorado. Santa Clara, Cuba. Universidad Central de las Villas. 119 p.
- Evans, DA; Bravo, JE. 1986. Phenotypic and genotypic stability of tissue culture plant. Ed. RH Zimmerman. Tissue culture as a plant production system for horticultural crops. p. 73-91.
- Evans, DA. 1989. Somaclonal variation – genetic basis and breeding application. Elsevier Science 5 (2): 46-50.
- García, AM; Acuña, ES. 2000. Comportamiento en condiciones de Masaya de plantas de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott), cultivar Masaya, obtenidas de tres técnicas de propagación. Tesis Ing. Agr. Managua, Nicaragua. Universidad Nacional Agraria. 39 p.
- George, EF. 1993. Plant propagation by tissue culture: The Technology. 2 ed. Great Britain. Exegetics. 574 P.
- Gómez Kosky, R. 1998. Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología: embriogénesis somática. Ed. JN Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba. IBP. p. 57-79.
- Gómez Kosky, R. 1998. Propagación y Mejora de Plantas por Biotecnología: cultivo de células y tejidos. Ed. JN Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba. IBP. p. 57-79.

- Gupta, PP. 1985. Plant regeneration and variabilities from tissue cultures of cocoyams (*Xanthosoma sagittifolium* and *X. violaceum*). Plant Cell Reports 4: 88-91.
- Hartman, HT; Kester, DE. 1985. Propagación de plantas: principios y prácticas. Trad. A Marino Ambrosio. 5 ed. México. CECSA. 814 p.
- Hu, CV y Wang, JP. 1983. Handbook of plant cell culture: Meristem, shoot tip and bud cultures. Eds. WR Sharp, DA Evans, PV Ammirato, Y Yamada. New York. Mac Millan. v.1. p. 177-227.
- Hwang, SC; Ko, WH. 1987. Banana and plantain breeding strategies: Somaclonal variation of bananas and screening for resistance to *Fusarium* wilt. Eds. Perseley, GJ, De Langhe EA.. p. 151- 156.
- Irawati; Webb, KL. 1983. Callus production and organogenesis from shoot tip petiole explants of six indonesian cultivars of *Colocasia esculenta* var. *Esculenta*. Annales Bogorienses 8 (1): 13-32.
- Jiménez González, EA. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología: generalidades del cultivo *in vitro*. Ed. JN Pérez Ponce. Santa Clara. IBP. p. 13-24.
- Jiménez González, EA. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología: Cultivo de Apices y Meristemas. Ed. JN Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba. IBP. p. 13-24.
- Larkin, PJ; Scowcroft, WR. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor Appl Genet 60: 197-214.

- Lindsey, K; Jones, MGK. 1989. Plant biotechnology in agriculture. Great Britain. Open University. 240 p.
- Litz, RE; Jarret, RL. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: regeneración de plantas en el cultivo de tejidos. Eds. WM Roca; LA Mroginski. Cali, Colombia. CIAT. p. 143-172.
- Litz, RE; Jaiswal, VS. 1991. Micropropagation technology and application: Micropropagation of tropical and subtropical fruits. Eds. PC Dbergh, RH Zimmerman. The Netherlands. Kluwer Academic. p. 95-122.
- Litz, RE. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: cultivo de embriones y óvulos. Eds. WM Roca; LA Mroginski. Cali, Colombia. CIAT. p.127-141.
- Liu, LJ; Rosa-Marquez, E; Licha, M; Biascoechea, ML. 1988. Tanier (*Xanthosoma* spp.) propagation in vitro. J Agric Univ P R 72 (3): 412-425.
- López Peralta, C. 1990. Fundamento teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales: medios de cultivo. Ed. CH Rosell. Roma, Italia. FAO. p. 15-19.
- López Zada, M, Vasquez Becalli, E y López Fleites, R. 1995. Raíces y tubérculos. Ed. A Valdivieso Valdivieso. Habana, Cuba. Pueblo y Educación. 304 p.
- López, MA; Castillo, I. 1996. Estudio preliminar del cultivo *in vitro* de ápices caulinares de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott). Tesis Ing. Agr. Managua, Nicaragua. UNA. 41 p.
- MAG-FOR (Ministerio de Agricultura y Forestal). 2000. Producción y comercialización de la malanga. Agricultura & Desarrollo. no. 60: 1-11.

- Murashige, T y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* (15). p. 473-497.
- Ndoumou, DO; Tsala, GN; Kanmegne, G; Balange, AP. 1995. In vitro induction of multiple shoots, plant regeneration and tuberization from shoot tips of cocoyam. *Life Sciences* (318): 773-778.
- Nguyen, TQ; Nguyen, VU. 1987. Aroids propagation by tissue culture: shoot tip culture and propagation of *Xanthosoma violaceum*. *HortScience* 22 (4): 671-672.
- Nyochembeng, LM; Garton, S. 1998. Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 53: 127-134.
- Nyman, LP; González, CJ; Arditti, J. 1983. Reversible structural changes associated with callus formation and plantlet development from aseptically cultured shoots of taro (*Colocasia esculenta* var. *Antiquorum*). *Annals of Botany Company* 51: 279-286.
- Pérez Ponce, J.N. (Ed.). 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología: Variación somaclonal. Santa Clara, Cuba. IBP. p. 105-121.
- Pérez Ponce, J.N. (Ed.). 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología: Mutagénesis *in vitro*. Santa Clara, Cuba. IBP. p. 297-326.
- Pohronezny, K; Dankers, W; Shaffer, B; Valenzuela, H; Moss, MA. 1990. Marginal necrosis and intercostal leaf spots of cocoyam infected by *Xanthomona campestris* pv. *dieffenbachiae*. *Plant Dis* (74): 573-577.
- Quintero, R. 1993. Perspectivas de la agrobiotecnología. IICA. 164 p.

- Quynh, NT Y Uyen, NV. 1987. Aroids propagation by tissue culture: I. Shoot tip culture and propagation of *Xanthosoma violaceum*. HortScience 22 (4). p. 671-672.
- Rojas, C.R. 1998. Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología: Cultivo de ápices y meristemas. Ed. JN Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba. IBP. p. 45-56.
- Rojas Castro, R. 1998. Reproducción de semilla limpia de tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium* y *X. Violaceum*) blanco y morado a partir de plantulas *in vitro*. Eds. A Silva; M Hernández. San José, Costa Rica. 39 p.
- Sabapathy, S; Nair, H. 1992. *In vitro* propagation of taro, with spermine, arginine and ornithine: Plantlet regeneration from primary shoot apices and axillary buds. Plant Cell Reports 11: 290-294.
- Sabapathy, S; Nair, H. 1995. *In vitro* propagation of taro, with spermine, arginine and ornithine: plantlet regeneration via callus. Plant Cell Reports 14: 520-524.
- Strauss, MS; Arditti, J. 1980. Plantlet regeneration from shoot tip cultures of *Xanthosoma caracu*. Annals of Botany company 45: 209-212.
- Swartz, HJ. 1991. Micropropagation technology and application: post culture behavior. Eds. PC Debergh; RH Zimmerman. Netherlands. Kluwer Academic. p. 95-122.
- Wakasa, K. 1979. Variation in plants differentiated from tissue culture of pineapple. Japan J Bread 29: 13-22.
- Yam, TW; Young, JL; Fan, KP; Arditti, J. 1990. Induction of callus from axillary buds of taro (*Colocasia esculenta* var. *Esculenta*, *Araceae*) and subsequent plantlet regeneration. Plant Cell reports 9: 459-462.

- Yam, TW; Webb, EL; Arditti, J. 1990. Callus formation and plantlet development from axillary buds of taro. *Planta* 180: 458-460.
- Yam, TW ; Hsu, GI; Arditti, J. 1990. Plant regeneration in vitro of South pacific taro (*Colocasia esculenta* var. *Esculenta* cv. Akalomamale, Araceae). *Plant Cell Reports* 9: 229-232.
- Yam, TW; Ichihashi, S; Arditti, J. 1991. Callus growth and plantlet regeneration in taro, *Colocasia esculenta* var. *Esculenta* (L.) Schott (Araceae). *Annals of Botany* 67: 317-323.

# **ANEXOS**

## ANEXO I

Tabla 16. Porcentaje de explantes de hojas verdes, amarillos y necrosados, como resultado del efecto de las combinaciones de ANA, 2,4-D y 2,4,5-T (1, 3 y 5 mgL<sup>-1</sup>) con 6-BAP (0, 1 y 3 mgL<sup>-1</sup>) en el cultivar Blanco de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)

Medio de cultivo (mgL <sup>-1</sup> )		Genotipo Blanco		
		Amarillo	Verde	Necrosado
Testigo	0:0	60	-	40
	1:0	84.61	-	15.39
	1:1	72.72	-	27.28
	1:3	66.66	-	33.34
	3:0	71.43	-	28.57
	3:1	81.81	9.09	9.1
	3:3	92.30	-	7.7
	5:0	78.57	-	21.43
	5:1	100	-	-
	5:3	100	-	-
ANA / 6-BAP	1:0	88.88	-	11.12
	1:1	100	-	-
	1:3	90	-	10
	3:0	90	-	10
	3:1	100	-	-
	3:3	78.57	7.14	14.29
	5:0	92.31	-	7.69
	5:1	100	-	-
	5:3	100	-	-
	2,4-D / 6-BAP	1:0	100	-
1:1		100	-	-
1:3		100	-	-
3:0		81.81	-	18.19
3:1		100	-	-
3:3		100	-	-
5:0		100	-	-
5:1		100	-	-
5:3		100	-	-
2,4,5-T / 6-BAP		1:0	100	-
	1:1	100	-	-
	1:3	100	-	-
	3:0	81.81	-	18.19
	3:1	100	-	-
	3:3	100	-	-
	5:0	100	-	-
	5:1	100	-	-
	5:3	100	-	-
	2,4,5-T / 6-BAP	1:0	100	-
1:1		100	-	-
1:3		100	-	-
3:0		81.81	-	18.19
3:1		100	-	-
3:3		100	-	-
5:0		100	-	-
5:1		100	-	-
5:3		100	-	-
2,4,5-T / 6-BAP		1:0	100	-
	1:1	100	-	-
	1:3	100	-	-
	3:0	81.81	-	18.19
	3:1	100	-	-
	3:3	100	-	-
	5:0	100	-	-
	5:1	100	-	-
	5:3	100	-	-
	2,4,5-T / 6-BAP	1:0	100	-
1:1		100	-	-
1:3		100	-	-
3:0		81.81	-	18.19
3:1		100	-	-
3:3		100	-	-
5:0		100	-	-
5:1		100	-	-
5:3		100	-	-

## ANEXO II

Tabla 17. Porcentaje de explantes de hojas verdes, amarillos y necrosados, como resultado del efecto de las combinaciones de ANA, 2,4-D y 2,4,5-T (1, 3 y 5 mgL<sup>-1</sup>) con 6-BAP (0, 1 y 3 mgL<sup>-1</sup>) en el cultivar Masaya de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)

		Genotipo Masaya		
Medio de cultivo (mgL <sup>-1</sup> )		Amarillo	Verde	Necrosado
Testigo	0:0	100	-	-
	1:0	100	-	-
	1:1	6.66	93.34	-
	1:3	14.28	85.72	-
ANA / 6-BAP	3:0	100	-	-
	3:1	100	-	-
	3:3	83.33	16.67	-
	5:0	100	-	-
	5:1	46.66	53.34	-
	5:3	42.85	57.15	-
	1:0	100	-	-
	1:1	58.33	41.67	-
2,4-D / 6-BAP	1:3	38.46	61.54	-
	3:0	100	-	-
	3:1	100	-	-
	3:3	-	100	-
	5:0	100	-	-
	5:1	14.28	85.72	-
	5:3	100	-	-
	1:0	100	-	-
2,4,5-T / 6-BAP	1:1	100	-	-
	1:3	100	-	-
	3:0	100	-	-
	3:1	100	-	-
	3:3	100	-	-
	5:0	100	-	-
	5:1	100	-	-
	5:3	100	-	-

### ANEXO III

Tabla 18. Efecto del cultivo de ápices en el medio MS (1962) adicionado con AIA y 2,4-D (1, 3 y 5 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con Kinetina (0, 1 y 3 mgL<sup>-1</sup>) en la inducción de callos en dos cultivares de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)

Genotipo	Medio de cultivo (mgL <sup>-1</sup> )	Brotos	Raíces	Plantas	Multiyemas	Callos	Necrosado
Masaya	Testigo 0:0	-	-	57.14	7.14	-	35.71
	1:0	-	21.42	64.28	-	-	14.28
	1:1	-	13.33	40	20	-	26.66
	1:3	-	-	-	-	-	100
	AIA / Kinetina 3:0	-	21.42	28.57	21.42	21.42	7.14
	3:1	10	-	20	50	-	20
	3:3	-	-	-	-	-	100
	5:0	38.46	33.33	-	30.76	-	3.76
	5:1	6.66	-	26.66	13.33	-	20
	5:3	26.66	-	-	40	-	33.33
	1:0	-	-	-	-	-	100
	1:1	8.33	-	-	-	25	66.66
	1:3	-	-	-	-	-	100
	2,4-D / Kinetina 3:0	-	-	-	-	-	100
	3:1	-	-	-	-	20	80
	3:3	-	-	-	-	-	100
	5:0	-	-	-	-	-	100
	5:1	16.66	-	-	-	-	83.33
5:3	-	-	-	-	-	100	
Genotipo	Medio de cultivo (mgL <sup>-1</sup> )	Brotos	Raíces	Plantas	Multiyemas	Callos	Necrosado
Blanco	Testigo 0:0	8.33	-	75	16.66	-	-
	1:0	-	30	60	10	-	-
	1:1	-	50	8.33	16.66	25	-
	1:3	-	22.22	11.11	66.66	-	-
	AIA / Kinetina 3:0	14.28	35.71	21.42	7.14	21.42	-
	3:1	-	28.57	-	28.57	28.57	14.28
	3:3	-	28.57	-	28.57	-	42.85
	5:0	-	40	-	-	60	-
	5:1	33.33	33.33	-	22.22	-	11.11
	5:3	35.71	-	7.14	7.14	-	50
	1:0	-	-	83.33	-	-	8.33
	1:1	8.33	-	-	-	33.33	50
	1:3	16.66	-	-	-	-	100
	2,4-D / Kinetina 3:0	-	-	-	-	85.71	14.28
	3:1	-	-	-	-	-	100
	3:3	-	-	-	-	16.66	83.33
	5:0	-	-	-	-	-	100
	5:1	-	-	-	33.33	8.33	58.33
5:3	-	-	-	-	40	60	

## ANEXO IV

Tabla 19. Efecto del cultivo de peciolo en el medio MS (1962) adicionado con AIA y 2,4-D (1, 3 y 5 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con Kinetina (0, 1 y 3 mgL<sup>-1</sup>) en la inducción de callos en dos cultivares de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott)

Genotipo	Medio de cultivo (mgL <sup>-1</sup> )	Brotos	Raíces	Plantas	Callos	Necrosado	Verde		
Masaya	Testigo	0:0	-	-	-	-	100		
		1:0	-	-	-	-	17.2	82.80	
		1:1	-	-	-	-	-	100	
		1:3	-	-	-	-	37.0	63	
		AIA / Kinetina	3:0	-	-	-	-	63.33	36.67
			3:1	-	-	-	-	91.40	8.60
			3:3	-	-	-	-	80.63	19.37
			5:0	-	-	-	-	100	-
			5:1	-	-	-	-	-	100
	5:3	-	-	-	-	42.50	57.50		
	2,4-D / Kinetina	1:0	-	-	-	-	14.80	85.20	
		1:1	-	-	-	14.28	46.15	39.56	
		1:3	-	-	-	-	78	22	
		3:0	-	-	-	-	73.20	26.80	
		3:1	-	-	-	-	100	-	
		3:3	-	-	-	-	100	-	
		5:0	-	-	-	-	94.70	5.30	
		5:1	-	-	-	-	80.81	19.19	
5:3		-	-	-	-	83	17		
Blanco	Testigo	0:0	-	-	-	-	100		
		1:0	-	-	-	-	16.66	83.33	
		1:1	-	-	-	-	-	100	
		1:3	-	-	-	-	37.50	62.50	
		AIA / Kinetina	3:0	-	-	-	-	66.66	33.30
			3:1	-	-	-	-	92.30	7.70
			3:3	-	-	-	-	92.30	7.30
			5:0	-	-	-	-	100	-
			5:1	-	-	-	-	-	100
	5:3	-	-	-	-	42.85	57.14		
	2,4-D / Kinetina	1:0	-	-	-	-	14.28	85.71	
		1:1	-	-	-	-	46.15	53.84	
		1:3	-	-	-	-	80	20	
		3:0	-	-	-	-	72.72	27.27	
		3:1	-	-	-	-	100	-	
		3:3	-	-	-	-	100	-	
		5:0	-	-	-	-	92.30	7.70	
		5:1	-	-	-	-	81.81	18.81	
5:3		-	-	-	-	83.33	16.66		

## ANEXO V

Tabla 20. Efecto del cultivo de ápices en el medio MS (1962) adicionado con de Kinetina y 6-BAP (3, 5 y 10 mgL<sup>-1</sup>) en combinación con AIA (1 mgL<sup>-1</sup>) en la inducción de yemas adventicias en dos cultivares de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott).

Genotipo	Medio de cultivo (mgL <sup>-1</sup> )	P	p c/h	S c	N	Y A G	Y A P	T Y A	
Blanco	Testigo 0	71.42	-	-	-	-	28.57	28.57	
	3	35.71	14.28	-	-	42.85	7.14	49.99	
	Kinetina 5	30.76	7.69	7.69	-	23.07	30.76	53.83	
	10	21.42	-	7.14	35.71	-	35.71	35.71	
	Promedio	29.29	7.32	4.94	11.9	21.97	24.53	46.51	
	3	26.66	-	-	-	53.33	20	73.33	
	6-BAP 5	20	6.66	6.66	-	40	26.66	66.66	
	10	14.28	7.14	21.42	-	21.42	35.71	57.13	
	Promedio	20.09	4.6	9.36	-	38.25	27.45	65.70	
	Promedio total		31.46	5.11	6.13	5.10	25.81	26.36	52.17
	Masaya	Testigo 0	80	6.66	13.33	-	-	-	-
		3	20	20	26.66	-	13.33	20	33.33
Kinetina 5		28.57	35.71	21.42	-	-	14.28	14.28	
10		-	6.66	6.66	60	13.33	13.33	26.66	
Promedio		16.19	20.79	54.74	20	8.88	15.87	24.75	
3		-	7.14	-	-	85.71	7.14	92.85	
6-BAP 5		7.69	7.69	15.38	-	46.15	23.07	69.58	
10		-	9.09	-	-	27.27	63.63	90.90	
Promedio		2.56	7.97	5.12	-	53.04	31.28	84.44	
Promedio total			19.46	13.27	11.92	8.57	26.54	20.20	46.8

P = planta

P c/h = planta con hijos

N = necrosados

Y A G = yemas adventicias grandes

Y A P = yemas adventicias pequeñas

S c = sin crecimiento

T Y A = total de yemas adventicias

## ANEXO VI

Tabla 21. Contenido químico del medio básico de cultivo de Murashige y Skoog (1962)

Sustancia	Concentración (mgL <sup>-1</sup> )	Vol. de solución madre / L. Medio basal
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	82.49	
KNO <sub>3</sub>	94.99	20 ml
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	18.49	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.49	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	21.76	
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.6	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25	1.0 ml
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025	
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025	
KI	0.75	3.0 ml
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	150	2.9 ml
Na <sub>2</sub> EDTA	7.46	
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	5.57	5 ml
Tiamina HCl	0.1	10 ml
Mio-inositol	100	12.5 ml

## ANEXO VII



Figura 5. Callos producidos a partir de ápices de quequisque



Figura 6. Yemas adventicias producidas a partir de ápices de quequisque