



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA**

TRABAJO DE DIPLOMA

TÍTULO

**PRODUCCIÓN DE PLANTAS LIBRES DE VIRUS Y
MORFOGÉNESIS INDIRECTA A PARTIR DEL CULTIVO DE
MERISTEMO DE TRES GENOTIPOS DE QUEQUISQUE
(*Xanthosoma sagittifolium* (L.) SCHOTT)**

AUTOR:

Br. ROBERTO CARLOS LÓPEZ ROSALES

ASESOR:

Ing. Agr. M.Sc. GUILLERMO REYES CASTRO

MANAGUA, DICIEMBRE 2002

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a:

Dios quien es el autor de todas las cosas.

Mis padres Roberto López y Francisca Rosales ya que gracias a sus esfuerzos pude alcanzar una de mis metas propuestas.

Mis hermanos Jimmy, Edgard y Hassel López Rosales.

La memoria de mi abuelo Luis Rosales.

AGRADECIMIENTO

Primeramente agradezco a Dios nuestro señor por permitirme realizar el presente trabajo, a mis padres por el apoyo que me han brindado.

A mi tía Teresa Rosales por su valiosa ayuda.

A mi amigo y asesor Ing. Agr. MSc. Guillermo Reyes Castro por permitirme realizar el presente trabajo de tesis. A los Ing. Agr. Marbell Aguilar y Álvaro Benavides por su colaboración en el presente trabajo.

A mis compañeros de estudio Oscar Gutiérrez, Denis Cáceres, Teresa Gómez y Rosa Martínez.

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

INDICE GENERAL

Contenido	Pág.
Índice General	i
Índice de Tabla	iii
Índice de Figuras	iv
Índice de anexos	v
Resumen	vi
I INTRODUCCIÓN	1
Objetivo	5
Hipótesis	5
II MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1 Genotipos utilizados	6
2.2 Materiales y equipos	6
2.3 Medidas de asepsia	7
2.4 Preparación del material de siembra.....	7
2.5 Establecimiento de los ensayos	8
2.5.1 Ensayo 1: Obtención de plantas libres de virus a partir del uso combinado cultivo de meristemos y el diagnóstico con la prueba ELISA.....	8
2.5.1.1 Prueba ELISA de verificación de la presencia del DMV en plantas provenientes del campo	8
2.5.1.2 Prueba ELISA para evaluar el porcentaje de plantas infestadas con DMV en el campo.....	8
2.5.1.3 Cultivo de meristemos <i>in vitro</i> para la obtención de plantas libres del DMV.....	8
2.5.1.4 Prueba ELISA en plantas provenientes del cultivo <i>in vitro</i>	9
2.5.2 Ensayo 2: Obtención de callos a partir del cultivo de meristemos y regeneración de plantas a partir de callos.....	12
2.6 Análisis estadístico	13

III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
3.1	Ensayo 1. Obtención de plantas libres de virus a partir del uso combinado del cultivo de meristemos y el diagnóstico con la prueba ELISA.....	14
3.1.1	Diagnóstico con la prueba ELISA a plantas provenientes de condiciones de los productores.....	14
3.1.2	Producción de plantas libres del DMV a partir de la aplicación de cultivo de meristemos <i>in vitro</i> y la técnica ELISA.....	17
3.1.2.1	Color de los meristemos	17
3.1.2.2	Crecimiento de los meristemos	21
3.2	Ensayo 2. Obtención de callos a partir del cultivo de meristemos y la regeneración de plantas a partir de callos	25
IV	CONCLUSIONES.....	30
V	RECOMENDACIONES	31
VI	BIBLIOGRAFIA	32
VII	ANEXO	38

Índice de tablas

Tabla	Contenido	Pág.
1	Concentraciones combinadas de 6-BAP y AIA utilizadas en el ensayo para la obtención de plantas libres del DMV a partir del cultivo de meristemos de los clones de quequisque Nueva Guinea, Masaya y Blanco.	9
2	Concentraciones de 2,4-D y 6-BAP empleadas en el ensayo de inducción de callos a partir del cultivo de meristemos en los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco.	12
3	Escalas utilizadas para la evaluación de las variables crecimiento y color de los explantes en los ensayos de producción de plantas libres de virus y la inducción de callos a partir del cultivo de meristemos.	13
4	Promedio estadístico y porcentaje según escala de la variable color de los explantes (meristemos) de los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco, establecidos en 5 medios de cultivo.	18
5	Promedio estadístico y porcentual (escala) de la variable crecimiento de meristemos de los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco, establecidos en 5 medios de cultivo.	22
6	Promedio estadístico y porcentaje según escala de la variable crecimiento de los explantes, de los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco, establecidos en 5 medios de cultivo, en el ensayo de embriogénesis somática a partir del cultivo de meristemos.	25
7	Porcentaje de callos con yemas formadas en los genotipos Masaya, Nueva Guinea y blanco a los 60 días después del trasplante al medio simple.	29

Índice de figuras

Figura	Contenido	Pág.
1	Prueba inmunoenzimática para la detección de virus: ELISA, versión “sándwich de anticuerpo”; cadena anticuerpo-antígeno-conjugado-substrato, similar al utilizado en el presente estudio.	11
2	Porcentaje de infección con DMV en plantas provenientes del campo que presentaron síntomas y plantas elegidas al azar, después de realizarse la prueba ELISA.	15
3	Porcentaje de meristemas de tres genotipos de quequisque (My, NG y Bco) necróticos, amarillo y verdes a los 90 días después de su establecimiento.	19
4	Porcentaje de meristemas de quequisque necrótico, amarillo y verdes, a los 90 días después de su establecimiento en 5 medios de cultivo.	20
5	Desarrollo (%) de meristemas de plantas de tres genotipos de quequisque (My, NG y Bco) obtenidos a los 90 días después de su establecimiento en el ensayo de producción de planta libres del virus del DMV a partir del cultivo de meristemas.	23
6	Crecimiento (%) de meristemas de plantas de quequisque obtenidos a los 90 días después de su establecimiento en 5 medios de cultivo, en el ensayo de producción de plantas libres del virus del DMV a partir del cultivo de meristemas.	24
7	Crecimiento (%) de meristemas de plantas de tres genotipos de quequisque (My, NG y Bco) obtenidos a los 55 días después de su establecimiento en el ensayo de producción de callos a partir del cultivo de meristemas.	27
8	Crecimiento (%) de meristemas de plantas de quequisque obtenidas a los 55 días después de su establecimiento en 5 medios de cultivo, en el ensayo de producción de callos a partir del cultivo de meristemas.	28

Índice de anexos

Anexo N°	Contenido	Pág.
1	Cormos de quequisque proveniente de campo.	38
2	Trozos de cormos con yemas utilizados en la propagación convencional de quequisque.	38
3	Hoja de quequisque con síntomas del DMV.	39
4	Laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria.	39
5	Preparación del material de siembra.	40
6	Tamaño de los explantes previo a ser introducidos <i>in vitro</i> .	40
7	Meristemas a ser introducidos a condiciones <i>in vitro</i> .	41
8	Plantas de quequisque provenientes del cultivo de meristemas.	41
9	Callos de quequisque generados a partir del cultivo de meristemas.	42
10	Plantas generadas a partir de callos provenientes del cultivo de meristemas.	42

RESUMEN

Se establecieron dos ensayos con el objetivo de determinar en que condición de cultivo se induce: 1) mayor cantidad de plantas libres del DMV diagnosticado con la prueba ELISA; 2) mayor cantidad de callos y plantas regeneradas a partir de callos en tres genotipos de quequisque. Ambos ensayos se iniciaron utilizando meristemos como explantes. Los ensayos se establecieron en esquema de diseño DCA bifactorial: a) genotipos de quequisque, Masaya (My), Nueva Guinea (NG) y Blanco (Bco); b) 5 variantes medios de cultivos. Se realizaron 3 pruebas ELISA a plantas de los tres genotipos que presentasen síntomas del DMV en el campo, a plantas del campo seleccionadas al azar y a plantas provenientes del cultivo de meristemos. En el ensayo de saneamiento del DMV se empleó en el medio MS suplido con combinaciones de AIA y 6-BAP, y para el ensayo de producción de callos se utilizaron combinaciones de 2,4-D y 6-BAP. La regeneración de plantas a partir de callos se logró en el medio MS sencillo. El desarrollo de los explantes en el primer ensayo se cuantificó utilizando escalas arbitrarias para el color y el crecimiento. En el segundo ensayo se utilizó una escala para medir el desarrollo. A los datos de cada variable se realizó un ANDEVA y la prueba de rangos múltiples Tukey, al $\alpha = 0.05$, cuando hubo diferencias estadísticas entre tratamientos. Cien porciento de las muestras de hojas de plantas de los 3 genotipos que presentaban síntomas del DMV en el campo, resultaron positivas. Las plantas del campo de los genotipos My, NG y Bco elegidas al azar, registraron 88.32, 98.70 y el 90.00% de infección con el DMV; en cambio las plantas *in vitro* registraron 93.7, 100 y 100% libres de DMV en los mismos genotipos respectivamente. A los 90 días de establecido el primer ensayo, el medio MS sin reguladores de crecimiento resultó estadísticamente superior con 84% de explantes creciendo y 8% plantas formadas. El medio MS + 1 mg l⁻¹ 6-BAP + 1 mg l⁻¹ AIA registró los valores más discretos con 53% de explantes sin crecer y 41% plantas creciendo. El genotipo My fue superior en todos los medios con 90% de explantes creciendo y 7% plantas formadas. El genotipo Bco registró los más bajos valores con 58% de explantes sin crecer y 5% plantas formadas. Las variables color y crecimiento reportaron similar comportamiento. El medio de cultivo testigo fue estadísticamente superior con 64% de explantes color verde, 30% amarillo y 6% necróticos. El genotipo My sobresalió con 40% de explantes amarillos y 60% verdes. Los genotipos NG y Bco tuvieron comportamientos similares. En el ensayo de producción de callos, tres tratamientos resultaron estadísticamente superiores: el genotipo NG en el medio MS + 3 mg l⁻¹ 2,4-D (60% de explantes formando callos) y el genotipo Masaya en los medios MS+ 5 mg l⁻¹ 2,4-D y MS + 3 mg l⁻¹ 2,4-D (26.7 y 40% callos formados, respectivamente). No se registraron diferencias estadísticas entre los genotipos (16, 17 y 17% callos formados). El medio de cultivo MS + 3 mg l⁻¹ 2,4-D indujo la formación de 4% callos y 44% plantas. El medio de cultivo testigo (MS sin reguladores de crecimiento) resultó en 47% explantes sin crecer y ningún callo formado. Después de los 60 días del trasplante de los callos a un medio sin hormonas, los genotipos Masaya, Nueva Guinea y Blanco reportaron que el 94, 83 y 58 % regeneraron yemas respectivamente.

Palabras claves: Quequisque, *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott, saneamiento, cultivo de meristemos, callos, regeneración, genotipo (Masaya, Nueva Guinea y Blanco), crecimiento.

I. INTRODUCCIÓN

El quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) pertenece a la familia de las Aráceas, es una planta comúnmente cultivada en Centro, Suramérica, El Caribe, Hawai, Florida y ciertos países africanos. Es probable que sea de origen antillano, lugar donde se encuentra el mayor número de genotipos. En el trópico americano se estima que existen cerca de 40 especies de *Xanthosoma* nativas del lugar el cual es cultivado desde épocas precolombinas (INTA, 2000; López *et al.*, 1995; Onwueme & Charles, 1994).

El quequisque es cultivado en áreas tropicales y subtropicales del mundo, y es un cultivo muy importante para más de 400 millones de personas al nivel mundial (Onwueme & Charles, 1994). Al igual que otras raíces y tubérculos, las estructuras subterráneas del quequisque son una importante fuente de carbohidratos, grasas, vitaminas, y aminoácidos para la nutrición humana y la alimentación animal (Ndoumou *et al.*, 1995; Nyochembeng & Garton, 1998; Tambong *et al.*, 1997; Zandvourt *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 2000).

El tamaño extremadamente pequeño del grano de almidón en quequisque (3 μm) permite que sea recomendado por su alta digestibilidad (López *et al.*, 1995). Los cormelos se pueden consumir cocidos, también en forma de harina, en rodajas fritas, un alimento rico en proteínas y carbohidratos (Blanco, 1987).

La forma de propagación vegetativa de este cultivo es a través del corno, con lo que se logra reproducir la información genética del progenitor, garantizando la identidad y estabilidad genética de la descendencia, por lo que se espera un buen rendimiento de una población originada de una buena planta madre (Nyland, 1968). Sin embargo, esta forma de reproducción tiene la desventaja de transmitir y propagar plagas y enfermedades virales, fungosas y bacterianas. En general, los métodos de propagación tradicionales no son efectivos para mantener genotipos libres de enfermedades; por lo que, a través de esta vía ha sido grande la diseminación de enfermedades (Ramírez, 1983).

El virus de mayor importancia que afecta la producción de quequisque y malanga a escala mundial es el virus del mosaico del quequisque o Dasheen Mosaic Virus (DMV siglas en inglés), descrito en Florida por primera vez en 1970 por Zettler *et al.* El DMV presenta varios síntomas. El virus es portado por áfidos y no es letal, su principal efecto es retardar el crecimiento de la planta y reducir los rendimientos (MAGFOR, 2000; Ramírez, 1974; Morales & Zettler, 1977).

En la colección de campo de *Xanthosoma* y *Colocasia* comestibles del CATIE, el DMV fue el responsable de la pérdida de más del 50% de los cultivos (Salazar, 1985). Según Monge y Arias (1984), las plantas de quequisque con síntomas de virus tienen rendimientos de entre 25% y 51% menores que el de plantas sanas. En Nicaragua, estudios fitosanitarios sobre plantaciones de quequisque en Nueva Guinea y Río San Juan, realizados por Monteroso (1996) y Góngora (1997), no reportan la presencia de virus en sus evaluaciones. Sin embargo, en estudios realizados por Grío (2001); Castillo (2000); Cruz & Loza, (2000); Acuña (2000); García & Acuña (2000) quienes utilizaron la prueba ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, siglas en inglés) indican que el porcentaje de plantas con el DMV en tres poblaciones clonales de quequisque en Nicaragua oscila entre 88 y 92%.

Los estudios encaminados a la detección e identificación de virus varían en el tipo de técnica utilizada, entre las que se reportan la microscopía electrónica; técnicas moleculares basadas en el uso del principio de replicación del ADN a través de la PCR (Polimerase Chain Reaction, siglas en inglés); y técnicas enzimáticas, donde el test o la prueba ELISA es la de mayor uso y fácil adquisición. Dottin (2000) y Hernández (2000) reportan en Cuba una variante más barata y eficiente de esta técnica, la prueba de Ultramicro-ELISA

La prueba inmunoenzimática o técnica ELISA fue desarrollada en 1971 para emplearla en medicina y adoptada en 1977 a la patología vegetal para la detección de virus en plantas (Mroginski & Roca, 1991), estandarizada posteriormente por Salazar (1989; 1991).

El principio propuesto por Limasset & Cornvet (1949), en el cual la concentración relativa de virus disminuye acropetalmente hacia el meristemo apical, abrió la posibilidad de

obtener clones libres de enfermedad mediante la excisión, aislamiento y posterior cultivo *in vitro* de meristemos. La técnica del cultivo de meristemo como método de saneamiento se fundamenta, por lo tanto, en la distribución no uniforme de los microorganismos en las plantas infestadas y la disminución progresiva de su concentración hacia el ápice del tallo (Pérez, 1998). Esta técnica consiste en aislar asépticamente la región meristemática conteniendo 1-3 de los primordios foliares más jóvenes e implantarlo en un medio de cultivo estéril, con el propósito de inducir la diferenciación de células y tejidos en plantas completas.

En el cultivo de meristemos y ápices no existe ningún medio de cultivo universal, sin embargo, los medios basales propuestos por Murashige & Skoog (1962), con algunas modificaciones en sus ingredientes, han sido los que con más frecuencia se han utilizado. Un balance apropiado entre auxina y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos, ápices o yemas.

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

Entre las técnicas de cultivo de tejidos se encuentran los procesos de formación de callos y regeneración de órganos a partir de ellos. Los callos se pueden multiplicar y emplear en la regeneración de plantas, la cual permite su utilización para la propagación masiva. Algunos autores hacen referencia a obtención de individuos libres de virus debido a que el crecimiento celular ocurre a una unidad mayor que la replicación viral, la replicación del virus puede ser inhibida por la naturaleza meristemática del tejido del callo (Pérez, 1998).

Los procesos de morfogénesis indirecta pueden ser inducidos para efectos de micropropagación, como lo emplean la mayoría de investigadores; o para el mejoramiento

genético de las especies. En este último particular existen diferentes maneras de empleo. La variación somaclonal registrada en plantas generadas *in vitro* a través de cualquier vía, es una de las fuentes más reportadas de generación de variantes genotípicas. Este fenómeno se plantea aún mayor cuando se emplea la organogénesis indirecta (producción de callos para la posterior regeneración de plantas) como estrategias de reproducción.

Con esos mismos fines, la organogénesis indirecta también puede ser utilizada de manera combinada con la mutagénesis inducida. Esta estrategia es empleada todavía por mejoradores *in vitro*. Básicamente consiste en irradiar o aplicar mutagénicos físicos o químicos, con el propósito de inducir mutaciones cromosómicas o puntuales, multiplicar los callos y regenerar plantas que serán evaluadas y seleccionadas a nivel *in vitro*, invernadero y campo.

Finalmente la organogénesis vía callo está siendo utilizada consistentemente en los trabajos de mejoramiento genético a través del empleo de la transgénesis o producción de plantas transgénicas.

Con la realización del estudio actual se pretende utilizar de manera combinada el cultivo de meristemas y la técnica ELISA para obtener plantas de tres clones de quequisque libres del DMV; de igual manera desarrollar la metodología de morfogénesis indirecta a partir del cultivo de meristemas en los mismos genotipos. Se contribuirá de esta manera a mejorar los sistemas de producción del quequisque, a través de la utilización de las plantas sanas en la propagación masiva; poniendo en práctica un esquema de saneamiento de plantas y desarrollando un esquema de eficiente multiplicación.

Objetivo:

- Determinar cual condición de cultivo *in vitro* induce la obtención de mayor cantidad plantas libres del DMV; mayor cantidad de callos y la mayor regeneración de plantas a partir de callos, cuando se emplea el cultivo de meristemas como técnica *in vitro* de propagación de los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco.

Hipótesis:

Ho: Las condiciones del cultivo *in vitro* estudiadas no favorecen la formación de callos, la regeneración de plantas a partir de callos, ni la obtención de plantas libres del DMV cuando se emplea el cultivo de meristemas como explante en la propagación de los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco.

Ha: Las condiciones del cultivo *in vitro* estudiadas favorecen la formación de callos, la regeneración de plantas a partir de callos y la obtención de plantas libres del DMV cuando se emplea el meristemo como explante en la propagación de los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km 12 ½ carretera norte, en el departamento de Managua. El mismo tuvo una duración de 7 meses desde enero a julio de 2002.

2.1 Genotipos utilizados

-**Quequisque Nueva Guinea.** El material proviene de la comunidad de Yolaina, 10 km al sur de la comunidad de Nueva Guinea. Este material vegetal fue introducido de Costa Rica a la zona desde la década de los años 80's.

- **Quequisque Masaya.** El material se colectó en la finca de un productor en la comunidad de Pacayita departamento de Masaya. Este clon ha sido utilizado desde hace más de 100 años.

- **Quequisque Blanco.** Este material fue obtenido de la finca de un productor de la comunidad Pacayita, departamento de Masaya. El material vegetal fue introducido en el año 1998 como resultados de estudios realizados por el personal técnico del laboratorio de cultivo de tejidos de la UNA, quienes lo colectaron en la zona de Nueva Guinea.

2.2 Materiales y equipos

Los materiales utilizados en el estudio fueron: ácido clorhídrico (HCl), hidróxido de potasio (KOH), alcohol, hipoclorito de sodio (NaClO₃), reguladores de crecimiento (AIA, 6-BAP), macro y micronutrientes del medio básico de cultivo Murashige & Skoog (1962), sacarosa, agar, papel aluminio, cinta adhesiva, algodón, agua destilada, kit de reactivos para realizar el test ELISA (marca AGDIA) y agua desionizada.

Equipos utilizados: horno, mecheros, marcadores, autoclave, pinzas, pipetas, estereoscopio, beakers, tubos de ensayos, balanza analítica, escalpelos, placas petri esterilizadas, cuchillos,

tijera, cámara de flujo laminar, freezer (4 °C), agitador electromagnético, frasco erlenmeyer y medidor de pH.

2.3 Medidas de asepsia

Los equipos usados para el cultivo de tejidos: pinzas y escarpelos fueron esterilizados en horno a 180 °C por una hora. Los medios de cultivo y tubos de ensayos fueron esterilizados antes de la siembra en el autoclave a 121 °C y a una atmósfera de presión durante 20 minutos. El cuarto de siembra y la cámara de flujo laminar se desinfectó previ6 a la siembra con luz ultra violeta durante 15 minutos, luego se dejó media hora sin presencia de luz ultra violeta, para iniciar la siembra *in vitro*. El medio de cultivo fue luego vertido en platos petri descartables estériles en la cámara de flujo laminar.

2.4 Preparación del material de siembra

Los cormos fueron lavados y divididos en pequeños pedazos de aproximadamente 1 cm² largo-ancho de forma tal que cada fragmento pudiese contener una yema. Se lavaron posteriormente con detergente eliminando de este modo toda la tierra y suciedad de las yemas. Se procedió luego a la desinfección del material sumergiéndolo en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO₃) al 5% durante 5 minutos. Las yemas fueron luego colocadas en un recipiente que contenía agua desionizada.

2.5 Establecimiento de los ensayos

2.5.1 Ensayo 1: Obtención de plantas libres de virus a partir del uso combinado del cultivo de meristemos y el diagnóstico con la prueba ELISA.

Para encontrar una vía eficaz de la selección de plantas libres de virus, se realizaron tres pruebas ELISA para detección del DMV en plantas provenientes de cultivos en el campo y en plantas provenientes de cultivo *in vitro*.

2.5.1.1 Prueba ELISA de verificación de la presencia del DMV en plantas provenientes del campo.

Esta primera prueba se realizó a muestras de hojas de 40 plantas por genotipo que presentasen síntomas visibles de la infección con el DMV. El objetivo fue verificar si los síntomas presentes en las plantas correspondía a la infección con el DMV.

2.5.1.2 Prueba ELISA para evaluar el porcentaje de plantas infectadas con el DMV en el campo.

La segunda prueba ELISA se realizó a muestras de hojas de 60 plantas por cultivar, provenientes de diferentes zonas de cultivo y seleccionadas al azar.

2.5.1.3 Cultivo de meristemos *in vitro* para la obtención de plantas libres del DMV.

A las yemas preparadas se les eliminó con pinzas y escalpelos los primordios foliares hasta obtener el meristemo. Para el aislamiento del meristemo se utilizó el estereoscopio de disección CARL ZEISS 47 50 02 con un objetivo de 4x, para poder diferenciar y diseccionar los meristemos a un tamaño cercano a 0.2 mm de diámetro.

La siembra de los meristemos se realizó en un medio de cultivo depositado en platos petri estéril descartables de 9 cm de diámetro conteniendo 35 ml de medio. Se depositaron tres

meristemos por plato petri. En la tabla 1 se presentan las variantes de los medios de cultivo utilizado en el estudio de la obtención de plantas libres de virus a partir de meristemos.

Tabla 1. Concentraciones combinadas de 6-BAP y AIA utilizadas en el ensayo para la obtención de plantas libres del DMV a partir del cultivo de meristemos de los clones de quequisque Nueva Guinea, Masaya y Blanco.

Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	
	AIA	6-BAP
1 (testigo)	0.0	0.0
2	0.5	0.5
3	1.0	0.5
4	0.5	1.0
5	1.0	1.0

Después de la siembra los platos petri fueron sellados con papel teflón e introducidos posteriormente en el cuarto de crecimiento a temperatura de 25 ± 2 °C en condiciones de 12 horas luz-oscuridad, a una intensidad de 2000 lux.

A los 90 dds se realizó la toma de datos evaluando las variables: color y crecimiento del explante. Se procedió luego a realizar el trasplante de cada meristemo a un tubo de ensayo que contenía 10 ml de medio de cultivo básico MS más 2 mg L⁻¹ de 6-BAP, el cual sirvió para desarrollar plantas. Estas plantas estuvieron en estas condiciones por un período de 80 días.

2.5.1.4 Prueba ELISA en plantas provenientes de cultivo *in vitro*.

A las plantas desarrolladas individualmente en cada tubo de ensayo se realizó el test ELISA utilizando muestras de hojas siguiendo instrucciones del protocolo AGDIA (pathoScreen Kit), cuyo procedimiento es el siguiente:

- A las plantas generadas a partir del cultivo de meristemos se les colectaron hojas y trozos de tallos que fueron colocados en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se le añadió luego 100 µl del búfer de extracción a razón de 10:1 (100 mg de muestra de hojas y 100 µl del

búfer). Posteriormente las muestras fueron maceradas con un micro mortero plástico en el tubo eppendorf.

- Se ubicaron luego 100 μ l del extracto hojas-búfer en cada uno de los 96 pocillos con cubierta de anticuerpo de la placa de poliestireno. La placa fue luego incubada en cámara húmeda por toda la noche a 4 °C.
- Quince minutos antes de terminar el tiempo de incubación se preparó el conjugado de enzima (anticuerpo), disolviéndolo en 1X del búfer respectivo.
- Cuando el tiempo de incubación hubo terminado, a la placa de poliestireno se le realizaron 4 enjuagues con búfer fosfato salino de lavado (1X PBST).
- Una vez secada las placas se depositaron 100 μ l del anticuerpo a cada pocillo; se dejó incubar por dos horas a temperatura ambiente.
- La placa fue lavada 4 veces con el búfer 1X PBST.
- Se añadió a cada celdilla de la placa 100 μ l del preparado de anticuerpo, dejándolo incubar por 45 minutos en cámara húmeda.
- Pasado el tiempo de incubación se eliminó el producto visible de la reacción y se practicó a la placa 4 lavados con el búfer de lavado 1X PBST.
- A cada pocillo de la placa se le depositaron luego 100 μ l de la solución reveladora PNP (fosfatasa) se dejó incubando por 30 minutos en cámara húmeda.

- Una vez terminado el tiempo de revelado se evaluaron los resultados. El color amarillo desarrollado en los pocillos indicaba resultados positivos, los que no lo hicieron indicaban la ausencia del DMV en ellos (Figura 1)

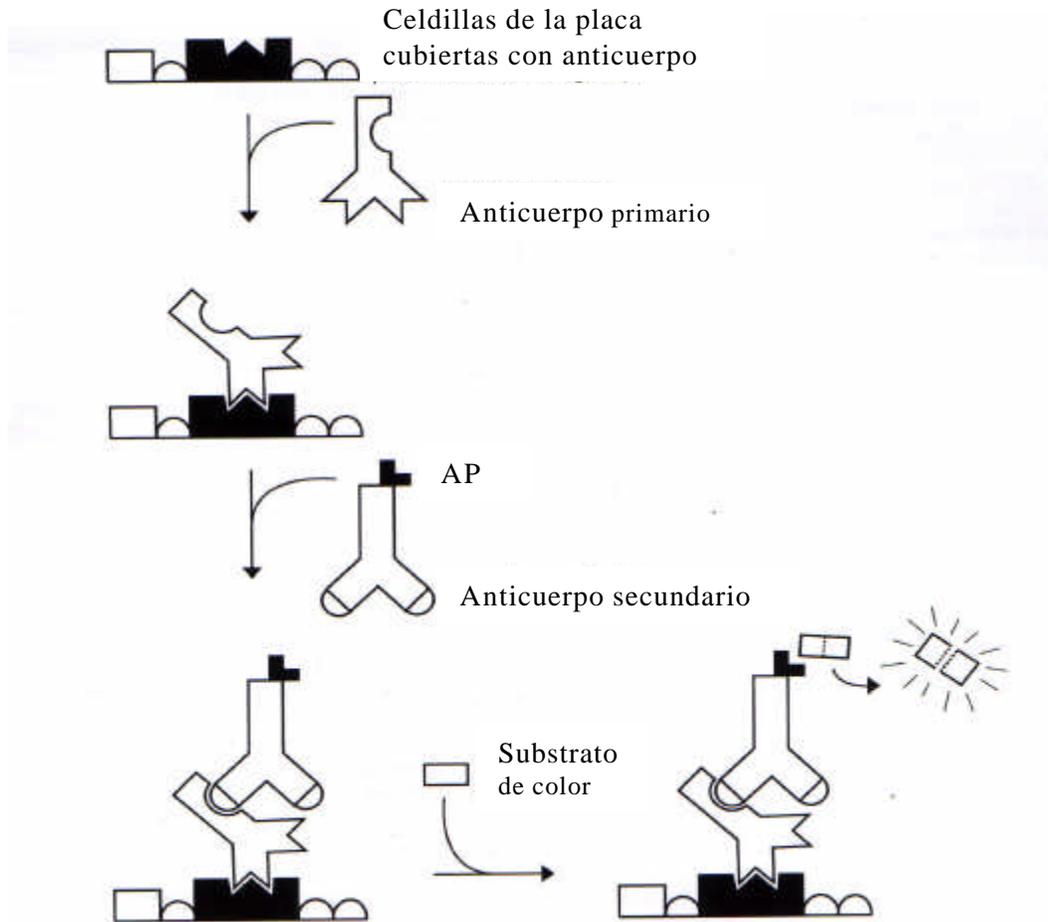


Figura 1. Prueba inmunoenzimática para la detección de virus: ELISA, versión "sandwich de anticuerpos"; cadena anticuerpo-antígeno-conjugado-substrato, similar al utilizado en el presente estudio.

(Tomado de Protocols and applications guide, PROMEGA, 1996).

2.5.2 Ensayo 2: Obtención de callos a partir del cultivo de meristemos y regeneración de plantas a partir de callos.

Para el aislamiento y siembra de los meristemos de las yemas seleccionadas, se efectuó el procedimiento descrito en el ensayo anterior. En la tabla 2 se muestra las variables de los medios empleados en el ensayo para obtener callos.

Tabla 2. Concentraciones de 2,4-D y 6-BAP empleadas en el ensayo de inducción de callos a partir del cultivo de meristemos en los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco.

Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento (mg l ⁻¹)	
	2,4-D	6-BAP
1 (Testigo)	0.0	0.0
2	5.0	0.0
3	5.0	1.0
4	3.0	0.0
5	3.0	1.0

Después de la siembra el material vegetal fue trasladado al cuarto de crecimiento con condiciones de 12 horas luz natural-oscuridad, con intensidad de 2000 lux y temperatura de 26 ± 2 °C. A los 55 dds se realizó la evaluación atendiendo componentes de la escala arbitraria para cuantificar el desarrollo de los explantes.

El trasplante de los callos formados a medio fresco se realizó a los 60 dds con un medio básico MS sin reguladores de crecimiento. Cuarenta días después se registraron datos del número de callos, multiyemas y plantas formadas.

2.6 Análisis estadístico

Las variables color y crecimiento se evaluaron utilizando escalas arbitrarias, las que se presentan en la tabla 3. La frecuencia de aparición de individuos clasificados como componentes de cada escala fue multiplicada por el valor arbitrario asignado a cada categoría. A estos datos se les practicó un análisis de varianza (ANDEVA) según metodología propuesta por Dottin (2000). Los datos porcentuales de las escalas color, crecimiento y desarrollo en ambos ensayos se presentan como tal en las tablas respectivas.

Tabla 3. Escalas utilizadas para la evaluación de las variables crecimiento y color de los explantes en los ensayos de producción de plantas libres de virus y la inducción de callos a partir del cultivo de meristemos.

Grado	Ensayo de producción de plantas libres de DMV		Ensayo de inducción a callos
	Crecimiento	Color	Desarrollo
1	Explante sin crecimiento	Necrótico	Sin crecimiento
2	Explante creciendo	Amarillo	Plantas formadas
3	Planta formada	Verde	Callos formados

Los ensayos se establecieron utilizando el esquema de diseño completo al azar (DCA), con 12 observaciones en el ensayo de producción de plantas libres de virus, y 15 observaciones en el ensayo de embriogénesis somática. En ambos ensayos los factores estudiados fueron: genotipos y medios de cultivo.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Ensayo 1. Obtención de plantas libres de virus a partir del uso combinado del cultivo de meristemos y el diagnóstico con la prueba ELISA.

3.1.1 Diagnóstico con la prueba ELISA a plantas provenientes de condiciones de los productores.

La prueba ELISA realizada a muestras de hojas de plantas que provenían del campo y que presentaban los síntomas visibles del DMV, indicó que el cien por cien de ellas estaban infectadas con el virus (Figura 2). Son diversos los síntomas que presentaban las plantas infestadas con el DMV, sin embargo, las que exhibían esos síntomas inequívocamente estaban infectadas con el virus. Lo que es lo mismo decir, cualquier evaluación visual realizada sobre la base de la diversidad de sintomatologías del DMV a plantas de cualquier plantación de quequisque, brindará una información importante sobre el estado fitosanitario de la plantación. Sin embargo, esta información será incompleta o no estará exenta de errores.

El DMV es un virus que ha sido encontrado en varios géneros de la familia Araceae (Hartman & Zettler, 1987) y está distribuido a nivel mundial (Van Der Merr, 1985; Escudero *et al.*, 1988; Chase & Zettler, 1982; Deborott & Ordosgoitti, 1974; Zettler *et al.*, 1987; Abo El-Nil *et al.*, 1977; Abo El-Nil & Zettler, 1976; Rodoni & Moran (1988); Ramírez, 1985; Dottin, 1997; Hill & Wright, 1980; Pearson *et al.*, 1998). Zettler *et al.*, (1989) señalan que el DMV no es letal y que su principal efecto es retardar el crecimiento de las plantas y reducir el rendimiento. Los síntomas foliares son intermitentemente expresados y la severidad y persistencia de estos síntomas varían de acuerdo al genotipo de la planta.

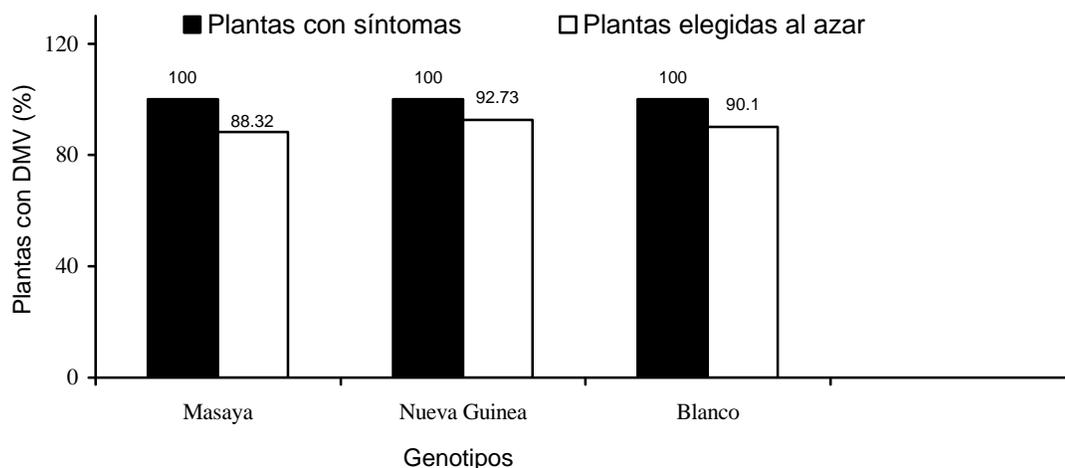


Figura 2. Porcentaje de infección con DMV en plantas provenientes del campo que presentaban síntomas y plantas elegidas al azar, después de realizarse la prueba ELISA.

Para Valverde *et al.*, (1997) las evaluaciones visuales subestiman la verdadera infección viral, puesto que muchas plantas infestadas no son detectadas. Zettler *et al.*, (1987) aseguran que el virus puede estar ausente o en pequeñas cantidades en tejidos que no presenten síntomas. En los programas de saneamiento y producción de semilla agámica, esto constituye una fuente potencial de diseminación del virus para las siguientes generaciones de plantas, por lo que se hace necesario un diagnóstico sistemático a través de técnicas de laboratorio.

Para Dottin (2000) la ausencia de síntomas en las plantas no es suficiente para seleccionar y obtener libres del DMV a ser introducidas al cultivo *in vitro*, es necesario hacer uso de técnicas serológicas de detección de las partículas virales.

La efectividad del uso de la técnica ELISA en la detección del DMV para algunos investigadores no es total. Hu & Wang (1988) recomiendan el uso repetido, al menos tres veces, de esta prueba serológica cuando se trate de multiplicar masivamente plantas a través de cultivo de tejidos; debido posiblemente a la escasa cantidad de partículas del virus en los tejidos evaluados.

Dottin (2000) utilizó la técnica de detección UM-ELISA, técnica recomendada por Hernández (2000), obtuvo resultados poco consistentes, atribuyéndolos a las bajas concentraciones del virus en el tejido. Sin embargo, cuando se evalúan las plantas que presentan los síntomas, Pearson *et al.*, (1998) utilizando técnicas de detección serológicas y de microscopía electrónica, registraron que el 100% de las plantas estaban infectadas y sin diferencias en cuanto la efectividad de las técnicas utilizadas.

El test ELISA realizado sobre las plantas de campo elegidas al azar indica que el 11.68, 7.27, y 9.90% de las plantas de los genotipos Masaya, Nueva Guinea y Blanco respectivamente, no presentaron partículas virales en sus estructuras foliares. Esto demuestra que es posible obtener plantas libres de virus a partir de poblaciones de plantas en el campo. Aunque los valores registrados en el presente estudio son menores ligeramente a los reportados por otros investigadores.

Dottin (1997) reporta proporciones cercanas al 30% de plantas en el campo libres del virus. Ramírez (1985) por su lado, indica que la incidencia del DMV en las plantaciones costarricenses es de por lo menos 80%. Morishita (1998) asegura que el DMV en las malangas japonesas (*Colocasia* spp.) están infectadas en 78-100%. Zettler *et al.*, (1987) comprobaron serológicamente que el 52% de las 139 accesiones de *Colocasia* cultivadas colectadas en la República Popular de China estaban infectadas, encontrando además que algunas *C. esculenta* silvestres estaban libres del virus. Hu & Wang (1994) detectaron el DMV en 36 de 54 cultivares hawaianos de *Colocasia*, recomendando además que, debido a la aparente distribución no uniforme del virus en las especies, se requieren múltiples realizaciones de ELISA en el tiempo y sobre diferentes tejidos de la planta.

3.1.2 Producción de plantas libres del DMV a partir de la aplicación de cultivo de meristemos *in vitro* y la técnica ELISA

Miller & Lipschutz, (1984) hacen referencia a la obtención de individuos libres de virus, según ellos, se debe a que el crecimiento celular ocurre a una velocidad mayor que la replica viral, indicando que la reproducción del virus puede ser inhibida por la naturaleza meristemática del tejido.

La prueba ELISA realizada en plantas provenientes del cultivo *in vitro* dieron como resultado que el 93.3, 100 y 100% de los genotipos Masaya, Nueva Guinea y Blanco respectivamente se encuentran libres del DMV.

En las Tablas 4 y 5 se presenta el resultado de los análisis estadísticos realizados a los datos de las variables color y crecimiento de los meristemos de los 3 genotipos que fueron desarrollados en los 5 medios de cultivo evaluados.

3.1.2.1 Color de los meristemos

El análisis comparativo general indica diferencias estadísticas entre los genotipos, los medios de cultivo estudiados y la interacción entre ellos. Cinco de los 8 mejores tratamientos se registran en el cultivar Masaya, 2 en el cultivar Nueva Guinea y 1 en el cultivar Blanco.

Tabla 4. Promedio estadístico y porcentaje según escala de la variable color de los explantes (meristemas) de los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco, establecidos en 5 medios de cultivo.

Tratamiento	Genotipos	Medios de cultivo	Color del explante (promedio)	Escala de color (%)					
				1 (necrótico)		2 (amarillo)		3 (verde)	
				%	Media	%	Media	%	Media
1	Masaya	1	2.58 ab	0.0		41.7		58.3	
2		2	2.33 abc	0.0		66.7		33.3	
3		3	2.83 a	0.0	0.0	16.7	40.0	83.3	60.0
4		4	2.58 ab	0.0		41.7		58.3	
5		5	2.66 ab	0.0		33.3		66.7	
6	Nueva Guinea	1	2.33 abc	16.7		33.3		50.0	
7		2	1.66 cd	41.7		50.0		8.3	
8		3	2.00 bcd	33.3	35.0	33.4	33.0	33.3	31.7
9		4	2.25 abc	16.7		41.7		41.7	
10		5	1.58 cd	66.7		8.3		25.0	
11	Blanco	1	2.83 a	0.0		16.7		83.3	
12		2	2.00 bcd	0.0		100.0		0.0	
13		3	1.25 d	75.0	40.0	25.0	43.0	0.0	16.7
14		4	1.42 d	50.0		50.0		0.0	
15		5	1.25 d	75.0		25.0		0.0	

Medias con letras distintas en la columna color, difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $\alpha = 0.05$.

Para efectos de cumplir con los objetivos del estudio los tratamientos que presentasen altos porcentajes de explantes necróticos serían los menos recomendables, pues inducirían en el material vegetal a una menor capacidad de adaptación a las condiciones de cultivo evaluadas y por lo tanto las plantas desarrolladas en ellos sucumbirían posteriormente. Por el contrario, aquellos tratamientos que registrasen porcentajes altos de explantes de color verde facilitarían la adaptación de los explantes y con ello habría muchas posibilidades ulteriores de generar plantas.

En el análisis de la variable color el genotipo Masaya resultó superior estadísticamente a los otros genotipos, los que a su vez fueron estadísticamente similares entre sí. En promedio 60% de los explantes del genotipo Masaya mostraron color verde y el restante 40% color amarillo. El genotipo Nueva Guinea mostró valores porcentuales promedios de 31.7, 33.0 y 35.0 en los colores verde, amarillo y necrótico. Por su parte, el genotipo Blanco lo hizo para los mismos colores con valores de 16.7, 43.3 y 40.0% respectivamente (Figura. 3).

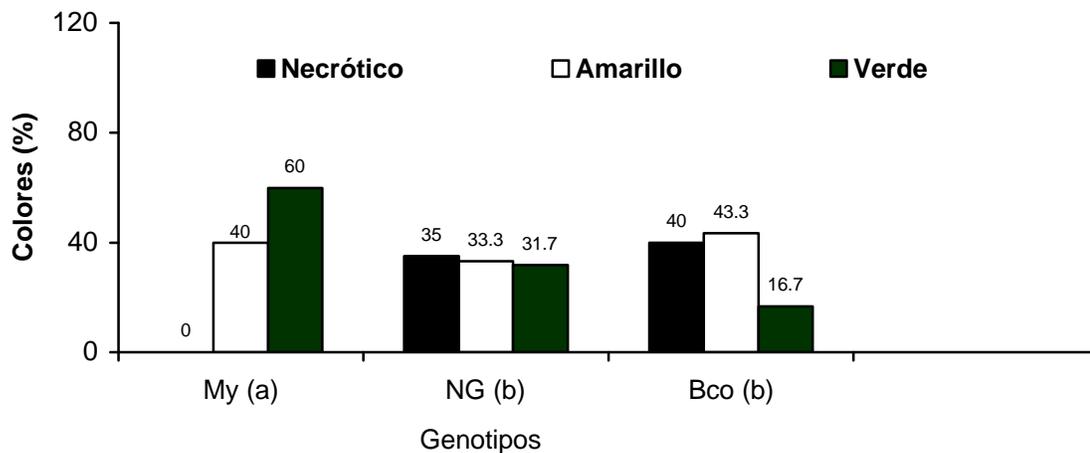


Figura 3. Porcentaje de meristemos de tres genotipos de quequisque (My, NG y Bco) necróticos, amarillos y verdes a los 90 días después de su establecimiento. Genotipos con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $\alpha = 0.05$.

Mroginski & Roca, (1991) reportan evidencias que indican que la variación en la respuesta a las condiciones de cultivo de tejidos depende en buena medida del genotipo utilizado.

Los resultados obtenidos en esta parte del estudio sugieren una clara respuesta del genotipo a las condiciones estudiadas. En las 5 variantes de medio de cultivo evaluadas los explantes del genotipo Masaya obtuvieron buenos resultados, todos estadísticamente similares. Los explantes desarrollados en el medio de cultivo 3 (MS + 1 mg l⁻¹ de AIA + 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP) registraron los más altos valores numéricos de explantes de color verde. En ninguno de los medios de cultivo señalados este genotipo registró meristemos necróticos.

Por el contrario, el genotipo Blanco obtuvo los más bajos valores numéricos de porcentaje de explantes de color verde, el más importante color a desarrollar. El genotipo Nueva Guinea presentó también valores discretos.

El contenido del medio de cultivo tuvo también una importante influencia sobre el comportamiento de los explantes de los diferentes genotipos. El medio de cultivo 1 (MS + 0 mg l⁻¹ de AIA + 0 mg l⁻¹ de 6-BAP) favoreció la producción de explantes de color verde en todos los genotipos y no reportó diferencias estadísticas significativas con los mejores 8 medios de cultivo. Este mismo medio de cultivo en el genotipo Blanco y el medio de cultivo 3 (MS + 1mg l⁻¹ de AIA + 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP) en el genotipo Masaya registraron 83% de explantes de color verde, los más altos valores porcentuales (Figura 4).

En promedio general el medio de cultivo 1 fue estadísticamente superior a los restantes con 64% de los explantes de color verde, 30% amarillo y 6% necrótico. En segundo lugar estadísticamente se encuentran los medios 2, 3, 4 y 5 presentando colores de los explantes con porcentajes de 14, 39, 32 y 31% verdes; 72, 25, 46 y 22% amarillos, y 14, 36, 22 y 47% necrótico respectivamente.

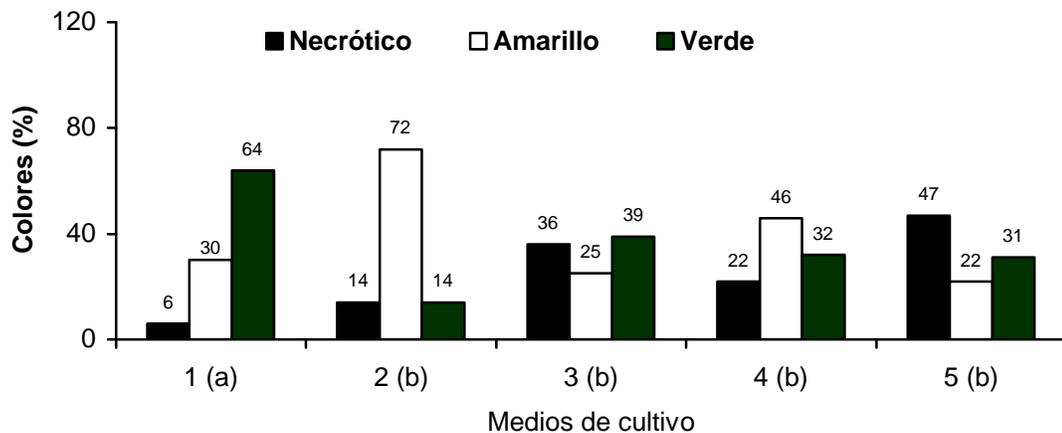


Figura 4. Porcentaje de meristemas de quequisque necróticos, amarillos y verdes, a los 90 días después de su establecimiento en 5 medios de cultivo.

Medios de cultivo con letras distintas difieren estadísticamente, según la prueba de Tukey para $\alpha = 0.05$.

En el cultivo de meristemas y ápices no existe un medio de cultivo universal; sin embargo los medios basales propuestos por Murashige & Skoog (1962), con algunas modificaciones en sus ingredientes, han sido los medio de cultivo que más frecuentemente reportan empleando la mayoría de los investigadores.

Los medios de cultivo 5 (MS + 1 mg l⁻¹ de AIA + 1 mg l⁻¹ de 6-BAP) y 3 (MS + 1 mg l⁻¹ de AIA + 0.5 mg l⁻¹ de 6-BAP) reportan los valores de explantes necróticos más bajos del estudio con 47 y 36% independientemente de los cultivares.

3.1.2.2. Crecimiento de los meristemas

Para esta variable se prefieren y seleccionan los tratamientos que presenten altos porcentajes de explantes en estadio de creciendo o transformado en una planta completa. El estadio de “creciendo” es el estadio inmediato inferior a la obtención de una planta formada, por lo que debe considerarse importante también. Algunos tratamientos pueden presentar regular número de plantas formadas con respecto a otros tratamientos, lo cual indicaría una mayor velocidad de crecimiento causadas por las condiciones del medio y los tratamientos. En cambio, los tratamientos que registrasen porcentajes altos de explantes sin crecer no tendrían muchas posibilidades de generar plantas.

Tabla 5. Promedio estadístico y porcentual (escala) de la variable crecimiento de meristemos de los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco, establecidos en 5 medios de cultivo.

Tratamiento	Genotipos	Medios de cultivo	Crecimiento de los explantes (promedio)	Escala de crecimiento (%)					
				1 (Sin crecer)		2 (Creciendo)		3 (Planta)	
				%	Media	%	Media	%	Media
1	Masaya	1	2.00 ab	0.0		100		0.0	
2		2	2.08 ab	0.0		91.7		8.3	
3		3	1.91 abc	8.3	3.36	91.7	90.0	0.0	6.64
4		4	2.16 a	0.0		83.4		16.6	
5		5	2.00 ab	8.3		83.4		8.3	
6	Nueva Guinea	1	1.75 bcd	25.0		75.0		0.0	
7		2	1.50 def	50.0		50.0		0.0	
8		3	2.00 ab	16.6	35.00	66.8	56.70	16.6	8.30
9		4	1.91 abc	25.0		58.4		16.6	
10		5	1.50 def	58.4		33.3		8.3	
11	Blanco	1	2.25 a	0.0		75.0		25.0	
12		2	1.58 cde	41.6		58.4		0.0	
13		3	1.16 fg	83.4	58.34	16.6	36.66	0.0	5.00
14		4	1.25 efg	75.0		25.0		0.0	
15		5	1.08 g	91.7		8.3		0.0	

Medias con letras distintas en la columna color, difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $\alpha = 0.05$.

Se registraron diferencias estadísticas en cuanto a crecimiento de los explantes entre los genotipos, los medios de cultivo estudiados y las interacciones entre ellos. Cinco de los 8 mejores tratamientos se registran en el cultivar Masaya, 2 en el cultivar Nueva Guinea y 1 en el cultivar Blanco.

El crecimiento de los meristemos para desarrollar plantas fue superior en el genotipo Masaya, que presentó 90% de los explantes creciendo próximos a ser plantas y un 7% de ellos convertidos en plantas formadas a los 90 dds. El genotipo Nueva Guinea presentó 57% de sus explantes creciendo y 8% en plantas formadas, ubicándose estadísticamente en segundo lugar. En tercer lugar se ubica el genotipo Blanco con 58% de los explantes sin crecimiento y 5% de plantas formadas (Figura 5).

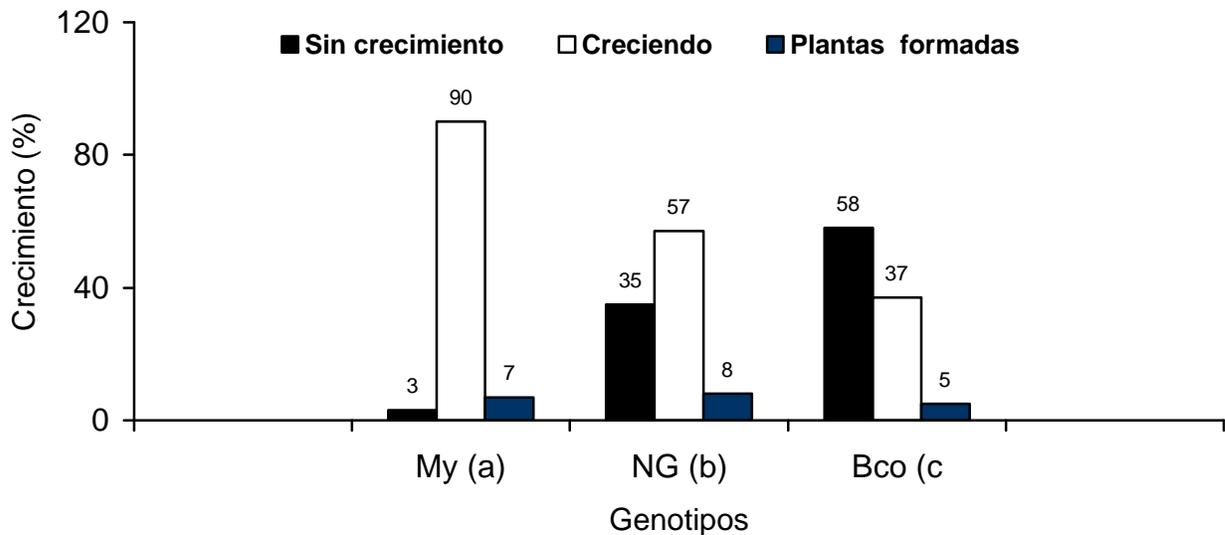


Figura 5. Crecimiento (%) de meristemos de plantas de tres genotipos de quequisque (My, NG y Bco) obtenidos a los 90 días después de su establecimiento en el ensayo de producción de plantas libres del virus del DMV a partir del cultivo de meristemos. Genotipos con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $\alpha = 0.05$.

Bernal (1997) menciona que existe una marcada influencia del genotipo en el éxito del cultivo de meristemos, donde los porcentajes de establecimiento varían entre especie, variedades y clones, en el caso de la papa los mejores resultados lo obtuvo la variedad Désirée.

George (1993) demostró que en plátanos y bananos se presenta con frecuencia diferencias entre genotipos y clones durante el establecimiento *in vitro*, en el género *Musa* los clones (AAA) tienen siempre mayor coeficiente de regeneración que los (ABB).

El medio de cultivo 1 (MS sin regulador de crecimiento) resultó estadísticamente superior con 84% de explantes en crecimiento y 8% plantas formadas, ubicándose en primera posición. En segunda posición estadística se ubican los medios de cultivos 2, 3 y 4 con 67, 58 y 56% de plantas creciendo y 3, 6 y 11% plantas formadas respectivamente. Según los resultados estadísticos el medio de cultivo 5 se ubica en tercer lugar por presentar 53% de plantas sin crecimiento y 41% de plantas creciendo (Figura 6)

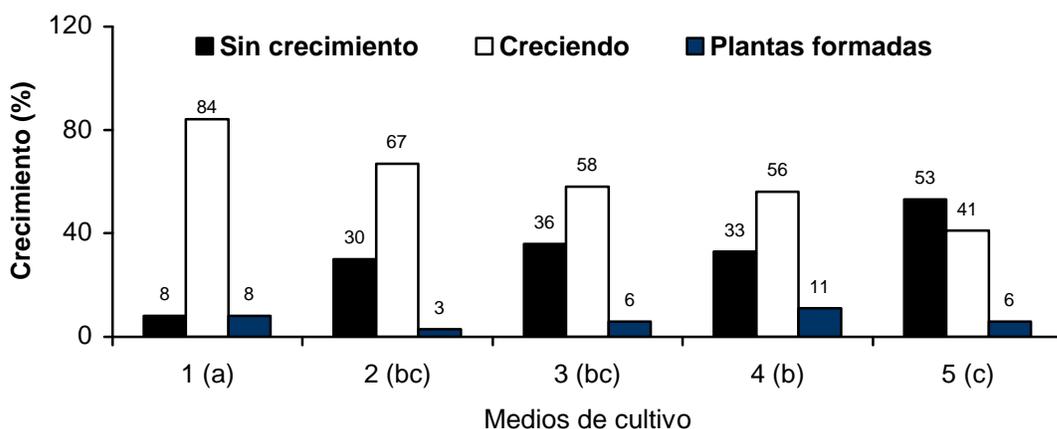


Figura 6. Crecimiento (%) de meristemos de plantas quequisque obtenidos a los 90 días después de su establecimiento en 5 medios de cultivo, en el ensayo de producción de plantas libres del virus del DMV a partir del cultivo de meristemos. Medios de cultivo con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $\alpha = 0.05$.

Según Dottin (2000), un balance apropiado entre auxina y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemos y ápices.

Hu & Wang (1994) reportan que en un 83% de los medios de cultivos se utilizan citoquininas. Contrario con la auxinas, ya que las zonas de crecimiento activo, los ápices y meristemos que son empleados como material inicial para el cultivo *in vitro*, son áreas de síntesis de auxinas por lo que la concentración endógena de las mismas es alta en ellos (Pérez, 1998).

Jiménez (1995) reporta que en caña de azúcar solo es necesaria la adición de 6-BAP como único estimulador de crecimiento logrando no solo la mayor regeneración de brotes, sino también la mayor producción de estos.

3.2 Ensayo 2. Obtención de callos a partir del cultivo de meristemos y la regeneración de plantas a partir de callos.

El establecimiento de cultivos de callos seguido con la formación de plantas vía organogénesis somática se ha estudiado en numerosas especies de plantas (Litz & Jarret, 1991). El callo es un crecimiento desorganizado de células obtenidas a partir de un determinado tejido (explante). Según Pérez (1998) en las células se presenta una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, dando origen a una masa amorfa de tejidos.

El análisis estadístico realizado a los datos de la variable crecimiento en el ensayo de obtención de callos a partir de meristemos, reporta la diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 6) y entre los niveles de factores estudiados (medios de cultivo y genotipos).

Tabla 6. Promedio estadístico y porcentaje según escala de la variable crecimiento de los explantes, de los genotipos de quequisque Masaya, Nueva Guinea y Blanco, establecidos en 5 medios de cultivo, en el ensayo de embriogénesis somática a partir del cultivo de meristemos.

Tratamiento	Genotipos	Medios de cultivo	Callos (promedio)	Escala de callos (%)					
				1 (Sin crecer)		2 (Planta)		3 (Callo)	
				%	Media	%	Media	%	Media
1	Masaya	1	1.33 g	66.7		33.3		0.0	
2		2	2.13 abc	13.3		60.0		26.7	
3		3	1.80 cdef	33.3	27.9	53.4	56.0	13.3	16.0
4		4	2.33 ab	6.6		53.4		40.0	
5		5	1.80 cdef	20.0		80.0		0.0	
6	Nueva Guinea	1	1.66 defg	33.3		66.7		0.0	
7		2	1.53 efg	60.0		26.7		13.3	
8		3	1.73 cdefg	33.3	38.6	60.0	44.0	6.7	17.3
9		4	2.46 a	13.3		26.7		60.0	
10		5	1.40 fg	53.3		40.0		6.7	
11	Blanco	1	1.60 defg	40.0		60.0		0.0	
12		2	1.93 bcde	20.0		66.7		13.3	
13		3	1.60 defg	66.7	36.0	6.6	46.6	26.7	17.3
14		4	1.93 bcde	26.7		53.3		20.0	
15		5	2.00bcd	26.7		46.6		26.7	

Medias con letras distintas en la columna callos, difieren estadísticamente para $p < 0.05$.

En este experimento se demuestra claramente que el empleo de una correcta manipulación *in vitro* podría conducir a la multiplicación de callos y a la regeneración de plantas sanas *in vitro*.

Algunos autores, en plantas regeneradas a partir de callos, hacen referencias a la obtención de individuos libres de virus (Abo-El-Nil, Y. C. Hilderbrant 1971; Miller y Lipshutz, 1984).

Pérez (1998) afirma que en todas las fases del cultivo de callos el genotipo juega un papel importante, por lo cual se debe trabajar siempre durante la investigación con 2 ó 3 genotipos.

En la inducción de callos a partir del cultivo de meristemo, no se encontraron diferencias estadísticas entre los genotipos los que presentaron valores de 16, 17 y 17% de callos formados y 56, 44 y 47% de plantas formadas para los genotipos Masaya, Nueva Guinea y Blanco (Figura 7).

Estudios realizados por Murillo & Suárez (2001) indican que el genotipo Blanco produce callos en mayor porcentaje que el genotipo Masaya cuando se utiliza en combinación con un medio que contenga 6-BAP (2 mg l^{-1}). Irawati & 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 del crecimiento y la dosis depende mucho del genotipo con que se trabaja, además plantea que algunos autores utilizan 2,4-D en diferentes concentraciones para la formación de callo.

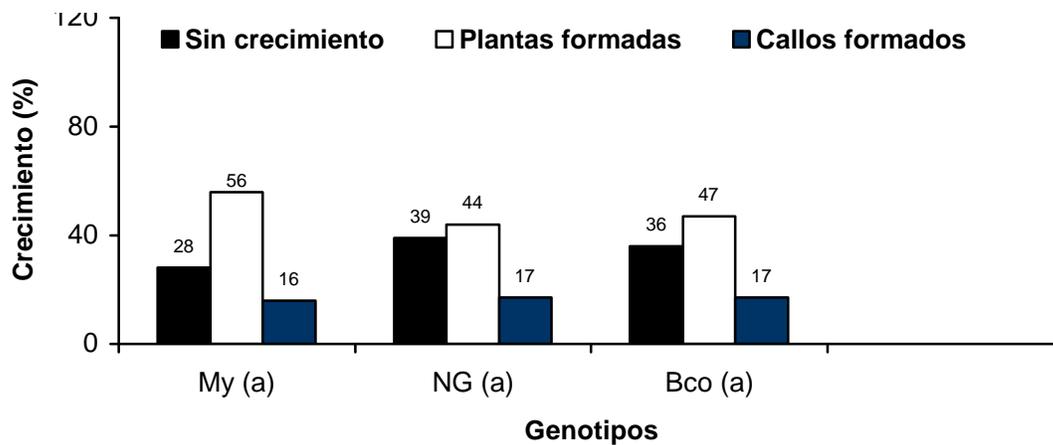


Figura 7. Crecimiento (%) de meristemos de plantas de tres genotipos de quequisque (My, NG y Bco) obtenidos a los 55 días después de su establecimiento en el ensayo de producción de callos a partir del cultivo de meristemos. Genotipos con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $\alpha = 0.05$.

Nguyen & Nguyen (1987) mencionan que la sacarosa influye en el crecimiento y desarrollo del callo con estructuras embriogénicas.

En el proceso inducción de meristemo a callos, el medio de cultivo 4 resultó ser el que indujo mayor porcentaje de explantes desarrollados en callos estadísticamente superior con 41% de callos formados y 44% de plantas formadas. En segunda posición estadística se ubica el medio de cultivo 2 presentando 18% de callos formados y 52% de plantas formadas. Los medios de cultivos 3 y 5 no son diferentes estadísticamente y se ubican en la tercera posición presentando 16 y 12% de callos formados, 40 y 55% plantas formadas respectivamente. El medio de cultivo uno ocupa la última posición estadística por presentar 47% de plantas sin crecimiento, 53% de plantas formadas y 0% de callos formados (Figura 8).

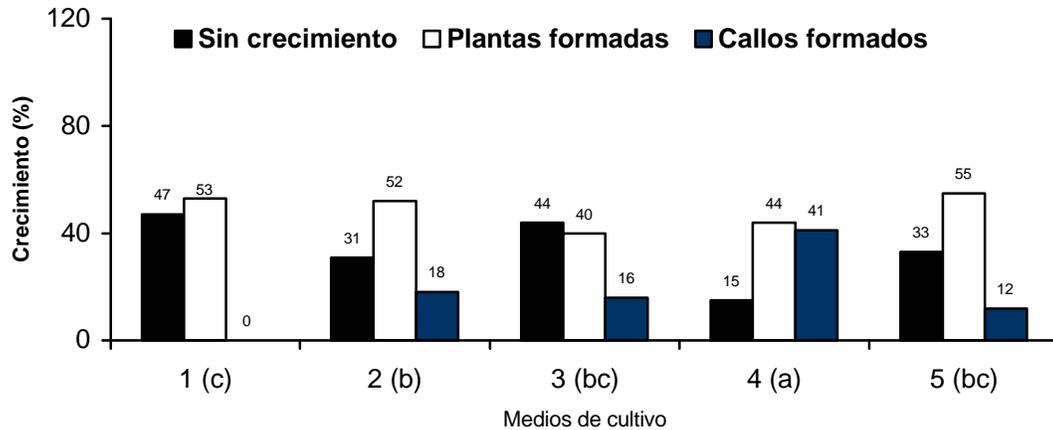


Figura 8. Crecimiento (%) de meristemos de plantas de quequisque obtenidos a los 55 días después de su establecimiento en 5 medios de cultivo, en el ensayo de producción de callo a partir del cultivo de meristemos. Medios de cultivo con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Tukey para $\alpha = 0.05$.

Algunos de los efectos biológicos producidos por las citoquininas pudieron estar condicionados por la presencia de AIA. Estos resultados coinciden con los referidos por algunos autores que recomiendan el uso de estos reguladores de crecimiento en la multiplicación de la malanga (Irawati & Webb, 1983; Gupta, 1993; García, 1997), aunque estas dosis pueden variar en dependencia del genotipo con que se trabaje.

Estos resultados concuerdan con lo planteado por Moller (1998), quien recomendó que es necesaria la presencia de la sacarosa junto con el AIA en el medio de cultivo antes de la diferenciación celular y que el nivel adecuado de sacarosa depende de los suplementos que se le añadan a un medio de cultivo.

Shakuntala (1995) afirma la importancia del papel que juega la sacarosa en los medios de cultivo como uno de los componentes orgánicos manejados para la inducción de la morfogénesis y su uso es recomendado en varias especies y específicamente en la malanga.

Trabajos reportados en *Xanthosoma* por Nyochemberg & Garton (1998), Litz & Jarret (1991), George (1993), Debergh & Read (1991) plantean que los resultados de la inducción

de callos en una misma especie suele estar relacionada al tipo de explantes utilizado. En el presente estudio al utilizar el meristemo como explante queda demostrado su eficiencia para la inducción de callos, donde se logró obtener un máximo de 60 callos formados (41%) a los 55 dds.

Según Nguyen & Nguyen (1987) los callos obtenidos a partir del cultivo de meristemo al ser transferidos a un medio libre de hormonas presentan la posibilidad de generar plantas.

En este ensayo, a los sesenta días después de haber transferido los callos a un medio sin hormonas, se presentan los siguientes resultados: 94, 83 y 58% de los callos en los genotipos My, NG, y Bco respectivamente regeneraron yemas (Tabla 7). Las estructuras como multiyemas aparentemente es la fase previa del desarrollo de las yemas puesto que todos los genotipos presentaron esta estructura.

Tabla 7 Porcentaje de callos con yemas formadas en los genotipos Masaya, Nueva Guinea y Blanco a los 60 días después del trasplante al medio simple.

Genotipos	# de callos	Yemas
Masaya	97	93.5
Nueva Guinea	36	83.3
Blanco	38	57.9

Irawati & Webb (1983) consideran que en callos caracterizados por ser nodulares, de coloración blanco amarillenta con estructuras que son embriogénicas, no es necesario subcultivarlos para generar plantas. Payán & Coil (1977) indican que la capacidad de los callos para regenerar plántulas es mayor cuando la inducción se realiza a los tres meses.

IV CONCLUSIONES

En el ensayo de obtención de plantas libres de virus a partir del uso combinado del cultivo de meristemos y el diagnóstico con la prueba ELISA, se concluye:

- 1- El 100% de las plantas provenientes del campo con síntomas del DMV estaban infectadas con el virus. En cambio el 12, 7 y 10% de las plantas elegidas al azar en los genotipos Masaya, Nueva Guinea y Blanco respectivamente, estaban libres de virus. De las plantas provenientes del cultivo de meristemos el 98, 100 y 100% de los genotipos Masaya, Nueva Guinea y Blanco respectivamente estaban libres de virus. Lo que demuestra la efectividad del método de saneamiento.
- 2- El genotipo Masaya se destacó por presentar los mejores resultados, registrando 60% de plantas color verde. El medio de cultivo 1 (MS sin reguladores de crecimiento) resultó con 64% de los explantes color verde.
- 3- El genotipo Masaya registró con 90% de los explantes en crecimiento y un 7% de plantas formadas. El medio de cultivo 1 (MS sin reguladores de crecimiento) registró 84% de explantes creciendo y 8% de plantas formadas a los 90 días después de la siembra.

En el ensayo de obtención de callos a partir del cultivo de meristemos y la regeneración de plantas a partir de callos, se concluye lo siguiente:

- 1- El crecimiento de los explantes fue superior en el medio de cultivo 4 (MS + 3 mgL⁻¹ de 2,4-D) con 41% de callos formados y 44% de plantas formadas, los genotipos Masaya, Nueva Guinea y Blanco no presentaron diferencia entre sí con un promedio de 16.5% de callos formados a los 55 dds.
- 2- Sesenta días después de transferidos los callos a un medio de cultivo sin hormonas, el 94, 83 y 58. 5% de los explantes de los genotipos Masaya, Nueva Guinea y Blanco respectivamente regeneraron yemas.

V. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios donde se evalué el comportamiento de las plantas *in vitro* (proveniente del cultivo de meristemo y la morfogénesis indirecta) en diferentes zonas de nuestro país.
- Realizar estudios similares al presente incluyendo cultivares de malanga (*Colocasia esculenta* (L.) Schott).

VI. REFERENCIAS

- Abo-El-Nil, & C Hilderbrant (1971) Dasheen Mosaic virus Plant Disease Reporter 55:1017-1020, Agrios G. N 1989. Plant pathology. Third edition. Academic press Inc. San Diego 624-640.
- Abo-El-Nil, M M & Zettler F W (1976) Natural occurrence of dasheen mosaic virus in Egyptian taro, colocasia antiquorum Plant Disease Reporter. 60; 281-285.
- Abo-El-Nil, M M, Zettler F W, Hiebert E (1977) Purification, serology and some physical properties of Dasheen Mosaic Virus. Phytopathology. 67: 1445-1450.
- Acuña Pérez M (2000) Comportamiento de tres cultivares clonales de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) en la comunidad de la Poma, Masaya. Pg. 38. Trabajo de tesis.
- Altamirano A M, Acuña R E (2000) Comportamiento en condiciones de Masaya de plantas de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) cultivar Masaya, obtenida de tres técnicas de propagación. Pg. 35. Trabajo de tesis.
- Bernal F (1997) Técnicas de saneamientos para la obtención de papas (*Solanum tuberosum*. L) libres del virus. Tesis de maestría, Instituto de Biotecnología de las plantas, Universidad Central de las Villas. 66 p.
- Blanco Navarro M (1987) Raíces y tubérculos. Managua, Nicaragua. 112 p.
- Castillo Lara J (2000) Comportamiento de dos cultivares clonales de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) en condiciones de REGEN-UNA, Managua, postrera 99-00. Tesis. Ing. Agr. Managua Nicaragua. UNA. 34. P.
- Chase A R, Zettler F W (1982) A pathogen free selection of *Diffenbanchia maculata* Derived Through Tissue Culture. Revista.
- Cruz C R & Loza S J (2000) Comportamiento de dos cultivares clonales de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) en condiciones de Yolaina Nueva Guinea, postrera 99-00 Tesis. Ing. Agr. Managua Nicaragua. UNA. Facultad de Agronomía; 34 p.
- Debergh P C, Read P E (1991) Micropropagation technology and application: Micropropagation. Eds. P. C. Debergh; R. H. Zimmerman, Nether Lands, Flower academic. P. 95-122.
- Deborott E A, Ordosgoitti A (1974) Dasheen Mosaic Virus infection of Colocasia and Xanthosoma in Venezuela. Plant Disease Reporter 58 (11): 1032-1034.
- Dottin M (1997) Tecnología para la micropropagación in vitro de clones de *Xanthosoma sagittifolium* (L). Tesis de maestría. Universidad central de las Villas, Santa Clara, Cuba, 99p.

- Dottin M P (2000) Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Tesis de doctorado. Universidad Central de las Villas. UCLV-Cuba.
- Escudero M F, Li D, Shepher D R (1988) Radio immunosorbent assay for detection of lecture mosaic virus in lettuce seed Plant Disease 66: (11) 1037-1040.
- García Altamirano A. M, Acuña Rios E S (2000) Comportamiento en condiciones de Masaya de plantas de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott) cultivadas en Masaya, obtenidas de tres técnicas de propagación. Trabajo de tesis.
- García M (1997) Tecnología para la micropropagación de la malanga: una solución al rescate de este cultivo en Cuba, BIOVEGE'97, Ciego de Ávila, libro de resúmenes, Cuba.
- George E (1993) Plant propagation by tissue culture part 1. The Technology. (ED) Exegetics Limited, Edington, wilts, Inglaterra, 9-65.
- Gómez L, Monge M, Valverde R, Arias O, Thorpe T (1989) Micropropagación de tres araceas comestibles libres de virus. Turrialba 39(2). Diario La Prensa.
- Gómez L, Saborio F, Salazar I, Arias O, Thorpe T (1991) Establecimiento y multiplicación *in vitro* de cuatro genotipos de ñampi (*Colocasia esculenta* Variedad antioquorum). 65p.
- Góngora J (1997) Evaluación fitosanitaria del cultivo de jengibre (*Zingibre officinale*) en Nueva Guinea y El Rama. 23p.
- Grio J (2001) Comportamiento de tres cultivares clonales de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) schott) en la comunidad de Santa Clara, Nueva Guinea, postrera 99-00. Trabajo de tesis.
- Gupta P (1993) Plant regeneration and variabilities from tissue culture of cocoyams (*Xanthosoma sagittifolium* and *Xanthosoma violaceum*). Plant cell reports, 4: 88-91.
- Hartman R D, Zetter F W (1987) Dasheen mosaic virus as a pathogen of cultivate aroid and control of the virus by tissue and other araceas plants. Pytopathology, 60: 983-987.
- Hartman R D (1974) Dasheen Mosaic Virus and oyer phyto pathogens eliminated from Caladium, Taro and Cocoyam by culture of shoot Tips. Pyhtopathology 64: 237-240.
- Hernández P (2000) Establecimiento de un sistema de diagnostico ELISA para DMV en araceas. Certificaciones de Vitroplantas de género comercial para la introducción en biofábricas, centro agrícola, Santa Clara, Cuba, 3-5. 65p.
- Hill S A & Wright D M (1980) Identification of Dasheen Mosaic Virus in Dieffenbachia picta and Xanthosoma helliborifolium by immune Electro Microscopy Plant-Pathology. 29-3, 143-144.

- Hu C & P Wang (1988) Meristem, shoot tip and bud culture. En: Evanns D A, Sharp W R, Ammirato, P V. (eds) Handbook of plant call culture Vol. Technique for propagation and breeding. MacMillan, New, 177-277.
- HU H S Meleisea & M Wang (1994) Department of plant Pathology. University of Hawaii, Honolulu 96822. Detection of Dasheen Mosaic Virus from Taro plants in the field and in tissue culture.
- INTA (2000) Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. Cultivo de Quequisque. Autores: Dávila Villegas, M. ; Valera Torres, D.; Saavedra, M. D. 2000. Cultivo de quequisque. Ed H. Obregón O. Managua, Nicaragua. INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria) 23p. (Guía Tecnológica 24).
- Irawati & Webb K L (1983) Callus production and organogenesis from shoot tip petiole explants of six Indonesia cultivars of *Colocasia Esculeta* var. *esculenta*. Annals Biorienses 8 (1); 13-32.
- Jackson G V, Ball E A, Arpitti J (1977) Tissue culture of Taro, (*Colocasia esculenta* (L) Schoot.) Journal of the Horticultural Science. 52: 373-382.
- Jiménez G E (1995) Producción in vitro de caña de azúcar (*Sarcharum* spp híbrido) Tesis de doctorado. Instituto de Biotecnología de las plantas, Universidad Central de Las Villas, 99 p.
- Limasset P D & Cornvet E F (1949) Plant propagation by tissue culture. Pp. 269-301.
- Litz & Jarret R L (1991) Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos embriogenesis somática y organogénesis. 143-172 p.
- López Zada M, Vázquez Becalli E, López Fletes R (1995) Raíces y Tubérculos eds. RM, Ojeda González; L J, Mora Llanos. Cd. La Habana. Pueblo y educación, p. 98-221.
- M Moroschita (1998) Taro (*Colocasia esculenta* Schott) Biotechnology in Agriculture and forestry, vol. 6. 14p.
- Miller E D & Lipschutz, J F (1984) The botany of cook's voyages. 14 (5/6). Revista.
- Ministerio de Agricultura y Forestal (MAGFOR) 2000 Producción y comercialización de la malanga. Agricultura y desarrollo. N°.60: 1-11.
- Moller E T (1998) Variation in tissue culture-derived rice plant. Thear appl bent., 80: 673-679.
- Monge M, Árias O, Ramírez P (1987) Obtención de plantas de Tiquisque blanco, morado y ñampi libres del virus promedio del cultivo *in vitro* de ápices. Agronomía Costarricense 11 (1) 71-79.

- Monge M, Árias O (1984) Efecto del virus del mosaico en Tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*). En Congreso Agronómico Nacional. San José. Costa Rica. p 197-198.
- Monteroso S D (1996) Jengibre y quequisque. Cultivos prioridades en el trópico húmedo. Informe de consultoría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza (CATIE) e Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 36. p.
- Morales F J & Zettler F W (1977). Fitopatol. Columbiana 6:134. Folleto.
- Mroginski L A, Roca M V (1991) Cultivo de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). N° 151. Pg. 674.
- Murashige T & F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and biossaya whit Tobago tissue culture, Plant Physiology, 15: 473-497.
- Murillo T M & Suárez M A (2001) Inducción de callos y Micropropagación a partir de yemas adventicias de dos cultivares de Quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Tesis de grado.
- Ndoumou N C, Chase A R, Stall J B (1995) Characterization of *Xanthomonas campestris* strains from aroids using physiological, pathological and fatty acid analysis. 82: 754-759.
- Nguyen T Q, Nguyen V U (1987) Aroids propagation by tissue culture: Shoot tip culture and propagation of *Xanthosoma violaceum* . Hortscience 22 (4): 671-672.
- Nyland G (1968) Development and maintenacnce of virus-frre propogating material. Proccedings of the Intertational Plant Propagators Society Annual Meeting.
- Nyochemberg H & T Garton (1998) Callus growth and plantlet regeneration in Taro, *Colocasia var. esculenta* (L) Schott (Araceae) Annals of Botany 69. 317-323.
- Onokpise I C, Charles W B (1994) Tropical root and tuber crops. Production perspective and future prospects. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation). Rome, Italy. P.85-86.
- Onwueme I C, Charles WB (1994) Tropical root and tuber crops. Production, perspectives and future prospects. Plant production and protection paper. 126. Food and Agriculture Organization of the United Nations. p 55. Rome.
- Payán A & Coil H (1977) Técnicas para la micro propagación de la caña de azúcar (*Sacharum officinarum* L) mediante el cultivo de tejidos y yemas. Acta agronómica (Colombia). 37. p 43-79.

- Pearson M N, Bussell W T, Acheffer I J C (1998) New Zeland Journal of crop and Horticultural science, vol. 26; pp. 69-70.
- Pérez J N (1998) Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Cultivo de ápices y meristemas. Vo. 1. Pg:143.
- PROMEGA (1996) Protocols and Applications Guide Third Edition. P.404.
- Ramírez P (1974) Plant Disease Reporter Turrialba vol. 35 N° 3 pp. 279-283.
- Ramírez P (1983) Center for Tropical Agriculture. International Programs. I. F. A. S. University of Florida in cooperation with CATIE and University of Hawaii. p. 22-23.
- Ramírez P (1985) Aislamiento y caracterización del virus del mosaico del "dasheen" (DMV) en Costa Rica. Turrialba. 35: 279-283.
- Rodoni S E, Moran J R (1988) The detection of dasheen mosaic virus using the enzymeliked immunosorbent assay (ELISA). Acta hort 281-283.
- Salazar L (1989) Informe sobre estandarización de una técnica para la detección del virus del mosaico del Dasheen. S. José. Costa Rica. CIA.14 p.
- Salazar L, Roy A, Gómez L (1991) Detección del virus del mosaico del Dasheen en araceas por la técnica radioinmuno ensayo. Agronomía Costarricense. 15(1/2).
- Salazar S (1985) Cultivo de meristemas en cormos, Raíces y Tubérculos Tropicales. En sistema de producción basados en raíces y tubérculos tropicales. Taller regional. CATIE (Centro Aronomico Tropical de Investigación y Enseñanza). Turrialba, Costa Rica.
- Scott G J, Rosegrant, M W, Ringler C (2000) Root and tubers for 21st Century. Trends, projections, and policy options. Food, Agriculture and Environment Discussion Paper No. 31. A co-publication of The International Food Policy Research Institute (IFPRI) and the International Potato Center (CIP), Washington, D.C.
- Shakuntala S U (1995) In vitro propagation of taro, with spermine, arginine and ornithine. Plant cell Reports 14: 520-524.
- Staritsky G (1980) In vitro storage of aroid germoplasm. Plant Genetics Resources Newslattre. 42: 25-27.
- Tambong K R, Volin B, W Bankers (1997) Bacterial leaf spot of cocoyam (*Xanthosoma caracu*) incited by *Xanthomona campestris* pv. *Dieffenbachia* in Florida. 69: 170-173.
- Van Der Merr F W (1985) Ocurrence of dasheen virus in South Africa. Phytophylactica 17: 95-98.

- Valverde R, Gomez L, Saborio F, Torres S, Arias O, Thorpe T (1997) Field evaluation of dasheen mosaic virus-free cocoyam plants produced by in vitro techniques. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. Scientia Horticultura 68, pp. 37-47.
- Zandvourt A R, Stellt N, Gnokipse O U (1994) Evaluation of cocoyam (*Xanthosoma saguittifolium*) clones for root rot blight complex resistance. Indian Genet. 50 (3): 216-220.
- Zettler F W, Tsai J H, Fraan H C, Ke C & Lu K E (1987) Dasheen Mosaic Virus infesting taro in people's Republic of China. Plant Disease 71: 873-839.
- Zettler F W (1989) Dasheen Mosaic Virus infesting taro in people's Republic. Of China, Plant Disease 72; 837-839.
- Zettler F W, Foxe M J, Hartman R D, Warson J R & Chritie R G (1970) Filamentous viruses infecting dasheen and other araceas plants. Pythopathology, 60; 983-987.

VII ANEXO



Anexo 1. Quequisques provenientes del campo.



Anexo 2. Trozos de cormos con yemas utilizados en la propagación convencional de quequisque.



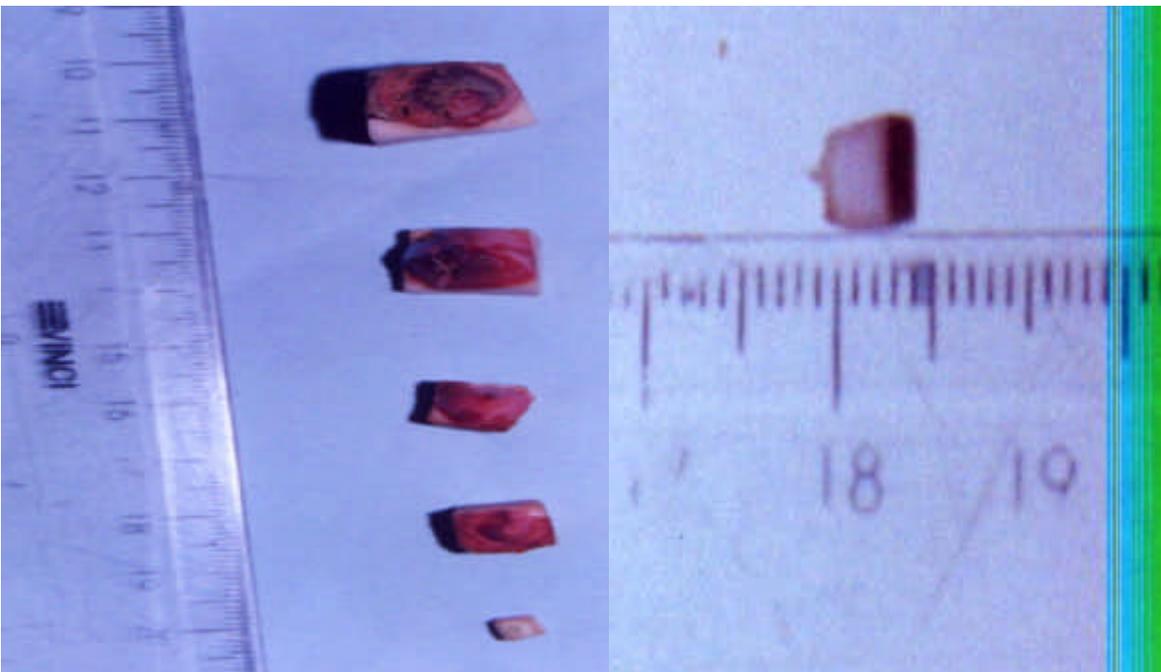
Anexo 3. Hoja de quequisque con síntomas del DMV.



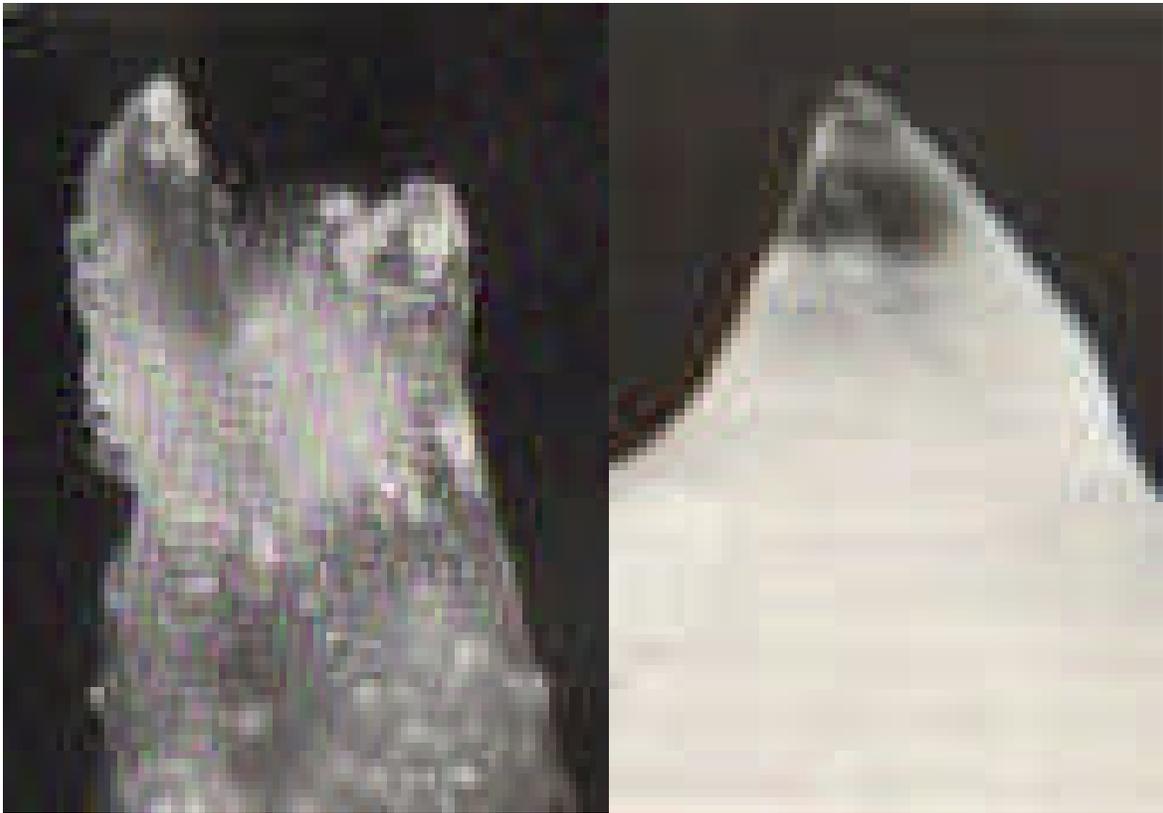
Anexo 4. Laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria.



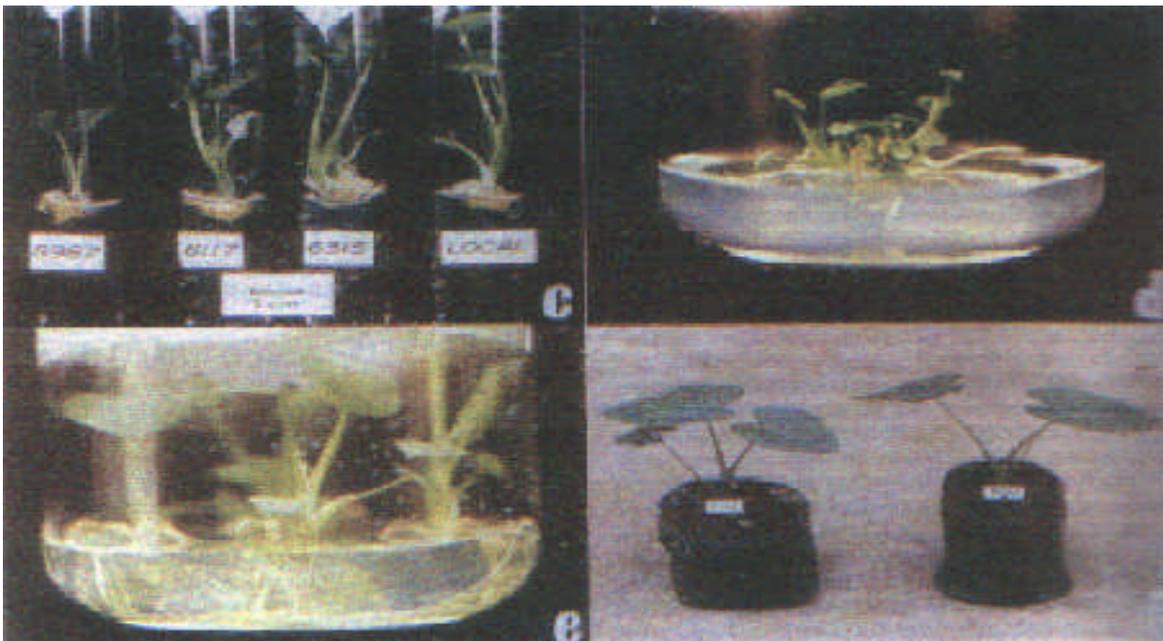
Anexo 5. Preparación del material de siembra.



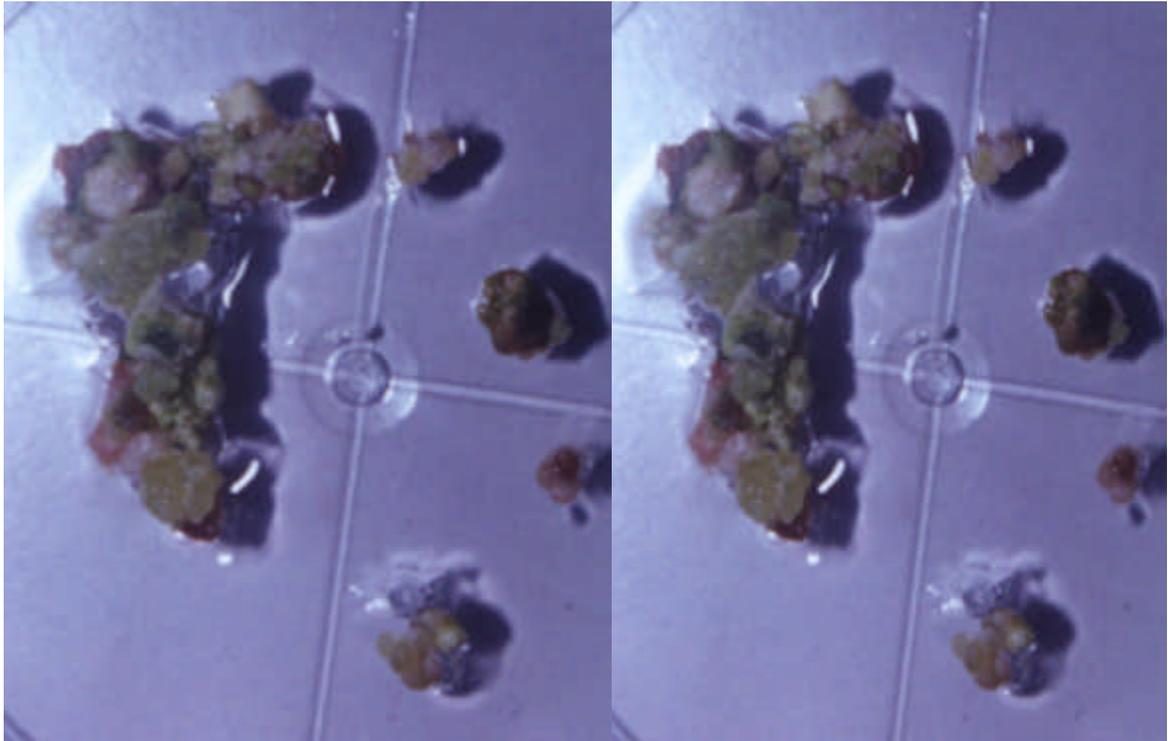
Anexo 6 Tamaño de los explantes previo a ser introducidos *in vitro*.



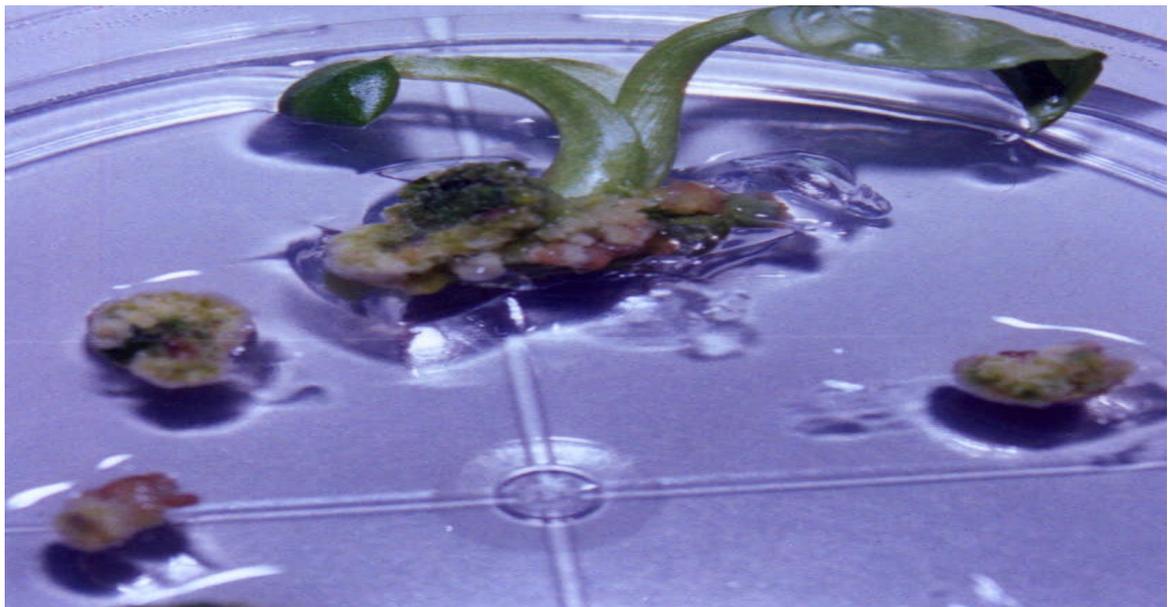
Anexo 7. Meristemas a ser introducidos a condiciones in vitro.



Anexo 8. Plantas de quequisque provenientes del cultivo de meristemas.



Anexo 9. Callos de quequisque generado a partir del cultivo de meristemos.



Anexo 10. Plantas generadas a partir de callos provenientes del cultivo de meristemos.