

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL**  
**PROGRAMA DE RECURSOS GENÉTICOS NICARAGÜENSE**



**TRABAJO DE DIPLOMA**

**ORGANOGENESIS DIRECTA Y EMBRIOGENESIS INDIRECTA EN EL  
CULTIVO DE QUEQUISQUE (*Xanthosoma* spp. L. Schott),  
CULTIVAR MASAYA.**

**AUTOR:**

**Br. ESTEBAN FERNANDO PAIZ CANO**

**ASESOR:**

**Ing. Agr. MARBELL AGUILAR MARADIAGA**

**Managua, febrero del 2006**

# ÍNDICE GENERAL

	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
	<b>ÍNDICE GENERAL</b>	i
	<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	iv
	<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	vii
	<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b>	ix
	<b>DEDICATORIA</b>	x
	<b>AGRADECIMIENTO</b>	xi
	<b>RESUMEN</b>	xii
<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
	Objetivos	3
<b>II</b>	<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	4
	Organogénesis	5
	Embriogénesis somática	7
<b>III</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	9
3.1	Organogénesis directa	9
3.1.1	Esterilización de materiales y equipo	9
3.1.2	Fase de establecimiento	10
3.1.2.1	Extracción de ápices	10
3.1.2.2	Medios de cultivo	11
3.1.2.3	Diseño experimental y análisis estadístico	12
3.1.2.4	Variables evaluadas	12
3.1.3	Fase de multiplicación	13
3.1.3.1	Selección del medio de cultivo	13
3.1.3.2	Diseño experimental y análisis estadístico	14
3.1.3.3	Variables evaluadas	14
3.1.4	Fase de enraizamiento	14
3.1.4.1	Medios de cultivo	15
3.1.4.2	Diseño experimental y análisis estadístico	15
3.1.5	Fase de aclimatización	15
3.1.5.2	Variables evaluadas y análisis estadístico	16

3.1.6	Efecto del número de explantes por contenedor	16
3.1.7	Inmersión temporal	16
3.1.7.1	Diseño experimental y análisis estadístico	17
3.1.7.2	Variables evaluadas	18
3.2	Embriogénesis indirecta	18
3.2.1	Fase de inducción de callos	18
3.2.1.2	Variables evaluadas y análisis estadístico	19
3.2.2	Fase de multiplicación de callos	20
3.2.2.1	Variables evaluadas y análisis estadístico	20
3.2.3	Fase de formación de embriones somáticos	21
3.2.3.1	Variables evaluadas y análisis estadístico	21
3.2.4	Fase de maduración de embriones somáticos	21
3.2.4.1	Variables evaluadas y análisis estadístico	22
3.2.5	Fase de germinación de embriones	22
3.2.5.1	Diseño experimental y análisis estadístico	23
3.2.6	Enraizamiento	23
3.2.7	Aclimatización	23
<b>IV</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
4.1	Organogénesis directa	24
4.1.1	Fase de establecimiento	24
4.1.1.1	Ápices de yemas terminales	24
4.1.1.2	Ápices de yemas axilares	27
4.1.2	Fase de multiplicación	31
4.1.2.1	Explantes de yemas terminales	31
4.1.2.1.1	Primer subcultivo	31
4.1.2.1.2	Segundo subcultivo	33
4.1.2.1.3	Tercer subcultivo	34
4.1.2.2.1	Explantes de yemas axilares	36
4.1.2.2.2	Primer subcultivo	36
4.1.2.2.3	Segundo subcultivo	38
4.1.2.2.4	Tercer subcultivo	39

4.1.3	Fase de enraizamiento	42
4.1.3.1	Explantes de yemas terminales	42
4.1.3.2	Explantes de yemas axilares	43
4.1.4	Fase de aclimatización	44
4.1.4.1	Explantes de yemas terminales	45
4.1.4.2	Explantes de yemas axilares	46
4.1.5	Número de explantes por contenedor	48
4.1.5.1	Explantes de yemas terminales	48
4.1.5.2	Explantes de yemas axilares	48
4.1.6	Inmersión temporal	49
4.1.6.1	Explantes de yemas terminales	49
4.1.6.2	Explantes de yemas axilares	50
4.2	Embriogénesis indirecta	52
4.2.1	Fase de iniciación de callos	52
4.2.2	Fase de multiplicación de callos	55
4.2.3	Fase de formación de embriones somáticos	56
4.2.4	Fase de maduración de embriones somáticos	58
4.2.5	Fase de germinación de embriones	60
4.2.6	Enraizamiento	61
4.2.7	Aclimatización	61
<b>V</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
<b>VI</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>66</b>
<b>VII</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>67</b>
<b>VIII</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>72</b>
<b>IX</b>	<b>GLOSARIO</b>	<b>78</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Medios de cultivo utilizados en la fase de establecimiento	12
2	Concentraciones de ácido indolacético (AIA) y de bencilaminopurina (BAP) en la fase de multiplicación	13
3	Concentraciones de sales y de ácido indolacético (AIA) en la fase de enraizamiento	15
4	Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de inducción de callos	19
5	Variantes de medios de cultivo en la fase de multiplicación de callos	20
6	Variables evaluadas en la fase de multiplicación de callos	20
7	Variantes de medios de cultivo en la fase de formación de embriones	21
8	Variantes de medios de cultivo en la fase de maduración de embriones	22
9	Variantes de medios de cultivo empleados en la fase de germinación de embriones	23
10	Longitud de plantas, número de hojas y longitud de brotes a los 60 días de establecidos, ápices de yemas terminales del cultivar Masaya	27
11	Longitud de plantas, número de hojas y longitud de brotes a los 60 días de establecidos, ápices de yemas axilares del cultivar Masaya	29
12	Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el primer subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas terminales del cultivar Masaya	31

13	Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el segundo subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas terminales del cultivar Masaya	33
14	Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el tercer subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas terminales del cultivar Masaya	35
15	Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el primer subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas axilares del cultivar Masaya	37
16	Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el segundo subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas axilares del cultivar Masaya	38
17	Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes y longitud de brotes, en el tercer subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas axilares del cultivar Masaya	40
18	Longitud de plantas, número de hojas y número de raíces, en plantas reproducidas de yemas terminales del cultivar Masaya, en la fase de enraizamiento	43
19	Longitud de plantas, número de hojas y número de raíces, en plantas reproducidas de yemas axilares del cultivar Masaya, en la fase de enraizamiento	43
20	Longitud de plantas, número de hojas, diámetro de pseudotallo y porcentaje de sobrevivencia a los 45 días, en plantas reproducidas de yemas terminales del cultivar Masaya, en la fase de aclimatización	45
21	Longitud de plantas, número de hojas, diámetro de pseudotallo y porcentaje de sobrevivencia a los 45 días, en plantas reproducidas de yemas axilares del cultivar Masaya, en la fase de aclimatización	46

22	Longitud de plantas, número de hojas, número de raíces, número de brotes y número de hojas por brote, en plantas obtenidas de yemas terminales del cultivar Masaya, por efecto de la densidad de explantes por contenedor en la fase de multiplicación	48
23	Longitud de plantas, número de hojas, número de raíces, número de brotes y número de hojas por brote, en plantas obtenidas de yemas axilares del cultivar Masaya, por efecto de la densidad de explantes por contenedor en la fase de multiplicación	49
24	Longitud de plantas, número de hojas, número de raíces, número de brotes en plantas reproducidas de yemas terminales del cultivar Masaya, utilizando el sistema RITA en la fase de multiplicación	50
25	Longitud de plantas, número de hojas, número de raíces, número de brotes en plantas reproducidas de yemas axilares del cultivar Masaya, utilizando el sistema RITA en la fase de multiplicación	50
26	Porcentaje de iniciación de callos, explantes con raíces y formación de plantas a partir de ápices meristemáticos del cultivar Masaya	53
27	Porcentaje de formación de callos en la fase de multiplicación, de acuerdo a la escala propuesta por Santana (1982), en el cultivar Masaya, en los diferentes tratamientos	55
28	Resultados de formación de embriones somáticos en el cultivar Masaya por efecto de diferentes medios de cultivos	57
29	Resultados en la maduración de embriones globulares en el cultivar Masaya por efecto de diferentes medios de cultivos	58
30	Porcentaje de plantas del cultivar Masaya germinadas a partir de embriones globulares en diferentes medios de cultivos	60
31	Resultados en promedio por planta, cuatro semanas después de enraizadas	61
32	Resultados en promedio por planta, cuatro semanas después de aclimatizadas	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Corno madre con yema apical y yemas axilares	10
2	Tamaño de tejido utilizado en la fase de establecimiento	11
3	Frascos utilizados en la fase de multiplicación	14
4	Contenedor de inmersión temporal automatizado (RITA)	17
5	Ápice meristemático, escala de 1 mm	19
6	Porcentaje de color verde, color marrón y planta formada en ápice de yemas terminales del cultivar Masaya. Arriba a los 30 días, abajo a los 45 días de establecidos, en nueve variantes de cultivo	25
7	Dinámica de diferenciación de ápice de yemas terminales y axilares del cultivar Masaya en fase de establecimiento	25
8	Porcentaje de color verde, color marrón y planta formada en ápice de yemas terminales del cultivar Masaya, a los 60 días de establecidos, en nueve variantes de cultivo	26
9	Porcentaje de color verde, color marrón y planta formada en ápice de yemas axilares del cultivar Masaya. Arriba a los 30 días, abajo a los 45 días de establecidos, en nueve variantes de cultivo	28
10	Porcentaje de color verde, color marrón y planta formada en ápice de yemas axilares del cultivar Masaya, a los 60 días de establecidos, en nueve variantes de cultivo	29
11	Escala de emisión de raíces en plantas regeneradas de yemas terminales en el primer subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya	32
12	Diferentes respuestas de plántulas del cultivar Masaya en la fase de multiplicación	31
13	Escala de emisión de raíces en plantas regeneradas de yemas terminales en el segundo subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya	34
14	Escala de emisión de raíces en plantas regeneradas de yemas terminales en el tercer subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya	35



15	Escala de emisión de raíces en plantas regeneradas de yemas axilares en el primer subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya	37
16	Escala de emisión de raíces en plantas regeneradas de yemas axilares en el segundo subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya	39
17	Escala de emisión de raíces en plantas regeneradas de yemas axilares en el tercer subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya	41
18	Plantas de 45 días de aclimatizadas propagadas de yemas terminales previamente enraizadas en medios líquidos y sólidos	46
19	Plantas de 45 días de aclimatizadas propagadas de yemas axilares previamente enraizadas en medios líquidos y sólidos	47
20	Plantas del cultivar Masaya, regeneradas por micropropagación en recipiente de inmersión temporal (RITA) con dos frecuencias de inmersiones	51
21	Callos friables a los 30 días de permanecer en el medio de cultivo.	53
22	Callos en crecimiento en fase de multiplicación	56
23	Embriones globulares y callo embriogénico con raíces	57
24	Embriones en estado cotiledonar, maduro y con raíces	59
25	Planta formada a partir de embriones globulares	60
26	Plantas obtenidas de la fase de aclimatización	62

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo</b>	<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1	Materiales y equipos	72
2	Composición del medio de cultivo base de Murashige y Skoog (1962) utilizado en el laboratorio	73
3	Laboratorio de cultivo de tejidos del Programa de Recursos Genético Nicaragüenses (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria	73
4	Proceso de propagación <i>in vitro</i> de quequisque	74
5	Fases en la producción en el proceso de micropropagación clonal	75
6	Costo de tesis en el proceso de investigación	76

## DEDICATORIA

**A Dios, altísimo!** motivo de mi inspiración. Me diste la pasión, la tenacidad y empuje para poder llegar hasta aquí. Has afirmado mis pensamientos,...y... mis sueños hoy son una realidad.

**A mis Padres, hermanos y amigos.** Este trabajo es el fruto de personas extraordinarias para mí, que me animaron y estuvieron conmigo, que siempre colaborando conmigo en las buenas y en las malas, que fueron hermanos y amigos a la vez, a ellos dedico mis primeras letras.

**Al lector.** Tampoco quiero obviar que este libro tiene importancia gracias a ti, que investigas y hurgas en el saber. Espero que este libro te sea de utilidad. Y no te olvides que... hay para más.

## AGRADECIMIENTO

**A Dios.** Por darme el entendimiento para reconocerlo en mis logros, ya que solo Él me da la victoria. Gracias Dios, gracias Jesucristo. Mis expectativas están llenas en ti, a ti sea la gloria. Gracias a ti YO SOY EL QUE SOY.

**Al mismo.** Gracias. Lo lograste esta vez, lo volverás a hacer, porque tienes el poder. Solo ten Fe.

**A mis padres, hermanos y demás familiares.** Gracias a su fidelidad y a sus oraciones genuinas he coronado esta carrera. Gracias Santiago Paiz, gracias Humbelia Cano por creer en mí. De manera muy pero muy especial le agradezco a mi tía Gloria Cano Márquez por su apoyo incondicional y desinteresado, en momentos difíciles me confortó. No me olvidaré fácilmente de todos ustedes que adnegablemente me apoyaron. Gracias.

**A mi asesor.** Le agradezco infinitamente al Ing. Marbell Aguilar, al Ing. Álvaro Benavides González y al Ing. Guillermo Reyes. Que por su constancia y su aporte este escrito fue completo, y puedo estar confiado de que lo hice bien. Muchísimas gracias teacher y que Dios te bendiga. Mis más sinceros agradecimiento a la Lic. Irma Vega que me apoyó con el escrito de este trabajo facilitándome su computadora profesora.

**A mis amigos.** Fueron muy eficaces sus consejos, su compañía, sus regaños, sus oraciones. Entre mis amigos está CECNIC (Comunidad de Estudiante Cristianos de Nicaragua) a quienes le agradezco por haber sido un haz de luz en mi vida punta de lanza en los centros de secundaria y universitaria, tu amigo que nunca muere te agradece, y adelante. De manera especial le agradezco a Miguel Zeledón, Silvio Morrás, Fernando Mendoza y Noé Herrera, compañeros de milicia, por su tenacidad, con que me han contagiado y juntos hemos llegado hasta el final.

Agradezco a doña Esmelda, a Urania, a Marilena, a Idalia, a Ing. Ena, a don chico, a Gabriel a Katy a Jacqueline, a Marlon, a Roberto, y a María Elena todos ellos por su colaboración, por haberme acogido y atendido con solicitud, por haberme brindado su mano amiga en momentos de necesidad.

Entre otros si no aparece tu nombre, no te ofendas, si eres mi amig@ y me tienes en alta estima y siempre te acuerdas de mí, aunque no está tu nombre aquí, créeme, estás en mi corazón. A todos ustedes gracias por su amistad, por haber pasado buenos y malos momentos juntos.

**Gracias... y pà delante.**

## RESUMEN

En el presente estudio se desarrollaron procedimientos para la micropropagación de quequisque, cultivar Masaya, en las fases de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatización; además, se realizaron experimentos para evaluar la respuesta a la técnica de recipientes de inmersión temporal automatizada (RITA) y el efecto que tiene el número de explante por frasco en cuanto al coeficiente de multiplicación para mejorar la eficiencia con el empleo de nuevos métodos de propagación masiva, también se estudió la embriogénesis somática. En los diferentes experimentos se utilizó como medio de cultivo las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS, 1962), y se definieron las concentraciones hormonales de auxinas y de citoquininas de acuerdo a la correspondiente fase de estudio. En la fase de establecimiento, a partir de explantes de yemas terminales el medio suplementado con 1mg/l de AIA y 2 mg/l de BAP favoreció a la mayor formación de plantas y con yemas axilares fue con el medio 1 mg/l de AIA y 1 mg/l d BAP. En la fase de multiplicación, con plantas formadas de yemas terminales, en el primer subcultivo, la mayor brotación se presentó en los medios que contenían 0.0 y 0.25 mg/l de AIA con 1 mg/l de BAP, mientras en el segundo y tercer subcultivo se dio con 0.50 mg/l de AIA con 2 y 3 mg/l de BAP; utilizando yemas axilares, en el primero y segundo subcultivo la mayor brotación se dio con 1 y 3 mg/l de BAP sin AIA, para el tercer subcultivo fue con 0.25 mg/l de AIA y 2 mg/l de BAP. En la fase de enraizamiento, utilizando las dos fuentes de explantes el mayor porcentaje de emisión de raíces se dio en el medio de consistencia líquido con sales al 50%. La aclimatización en plantas previamente enraizadas en un medio sólido al 100% de las sales la sobrevivencia fue del 100% para yemas terminales y del 96% para yemas axilares. En el número de explantes por frasco, la mayor brotación se presentó con cuatro explantes por contenedor para ambas fuente de tejidos. El sistema RITA, con plantas de yemas terminales indujo la mayor brotación con 3 inmersiones por día durante 7 minutos; no obstante con yemas axilares se presentó con 2 inmersiones. En embriogénesis indirecta la relación mayor porcentaje de formación de callos y menor formación de plantas fue en el medio constituido por las sales MS al 100% y 3 mg/l de 2,4-D. En la fase de multiplicación de callos, el porcentaje de crecimiento se dio con 10% de agua de coco y 0.4 mg/l de kinetina. El mayor porcentaje de embriones globulares formados fue en el medio con 30 mg/l de AIA. El mayor promedio de embriones globulares maduros se logró en el medio que se le agregó 0.1 mg/l de AIA y BAP. La germinación de embriones globulares fue mayor en el medio con 0.3 mg/l de BAP. En el enraizamiento y la aclimatización de plantas los resultados obtenidos fueron muy similares a los de organogénesis directa, con alta sobrevivencia (90%) y no hubo la presencia de plantas con variación genética.

## I. INTRODUCCIÓN

El quequisque (*Xanthosoma* spp.) es un cultivo originario de América, y es cultivado en áreas tropicales y subtropicales por ser un cultivo de gran importancia para millones de personas a nivel mundial (Onweme & Charles, 1994).

El quequisque pertenece a la familia de las Aráceas, al género *Xanthosoma* conformado por 45 especies muy difíciles de diferenciar, de las cuales las más importantes son *X. sagittifolium*, *X. atraviens*, *X. violacium* y *X. lindennii* (López *et al.*, 1995).

El cultivo de quequisque presenta varias cualidades que le han conferido un alto grado de importancia económica: alto potencial de rendimiento, alto poder de conservación en condiciones naturales, tamaño de los gránulos de almidón extremadamente pequeños que permite facilitar de cocción y alta digestibilidad, esto lo hace un producto de altas demanda en el mercado nacional e internacional (Blanco, 1992).

Como otros cultivos de raíces y tubérculos, el quequisque presenta una fuente muy importante en carbohidratos, grasas, vitaminas y aminoácidos útiles para la nutrición humana y alimento animal (Nyochembeng y Garton, 1998).

En América los principales países productores son: Republica Dominicana, Venezuela, Costa Rica e Islas del Caribe; además es cultivado en ciertos países Africanos. En Nicaragua se localiza principalmente en zonas húmedas como la Región Autónoma del Atlántico Sur, Nueva Guinea, El Rama y Río San Juan. También se cultiva en el norte del país en sitios como Waslala y Río Blanco, y en el Pacífico en los departamentos de Masaya, Granada, Carazo, Rivas, León y Chinandega, siendo Masaya el principal abastecedor.

La reproducción del quequisque se realiza a través de su cormo, semilla asexual o vegetativa (López *et al.*, 1995), esto garantiza una población con características

fenotípicas muy uniformes, por lo que se ha de esperar un buen rendimiento en un cultivar generado de una buena planta madre.

Según Rojas (1998), este sistema de reproducción favorece a la diseminación generalizada de enfermedades fungosas y virales. En los últimos años las áreas de siembra han sido reducidas drásticamente debido al daño que provocan en los cormos y cormelos el hongo (*Phytium myriotylum*) y en el follaje el virus conocido como Dasheen Mosaic Virus (DMV) en los diferentes genotipos de quequisque (INTA, 2000). Aunque según Zettler *et al.*, (1989), el DMV no es letal, pero retarda el crecimiento y el rendimiento del corno (Hartman, 1994; Monge, *et al.*, 1987).

Esta problemática plantea la necesidad de aplicar técnicas que fomenten este cultivo y permitan al agricultor obtener cosechas rentables, producto del empleo de semillas sanas y vigorosas.

La micropropagación ha favorecido la obtención de semilla de quequisque de mayor calidad gracias a que se garantiza el saneamiento de plagas y enfermedades de origen bacteriano y fungosas; además del gran volumen de plantas que se pueden producir en un corto período y en áreas reducidas (Ramírez, 1985). Sin embargo, la micropropagación se ve limitada por el tiempo necesario para la obtención de plantas sanas (Gómez, 1988).

En el presente estudio se desarrollaron procedimientos para la micropropagación de quequisque, cultivar Masaya, en las fases de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatización; además, se realizaron experimentos para evaluar la respuesta a la técnica de recipientes de inmersión temporal automatizada (RITA) y el efecto que tiene el número de explantes por frasco en cuanto al coeficiente de multiplicación para mejorar la eficiencia con el empleo de nuevos métodos de propagación masiva, también se estudió la embriogénesis somática. Por lo que se definieron los siguientes objetivos:

## **Objetivos:**

### **Objetivo general**

Estudiar las fases de organogénesis directa y de embriogénesis indirecta a partir de dos fuente de explantes en quequisque (*Xanthosoma* spp. (L.) Schott) cultivar Masaya.

### **Objetivos específicos**

1. Definir los mejores medios de cultivo en organogénesis directa en las fases de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y su posterior aclimatización en el sombreadero, con el cultivar Masaya.
2. Determinar el efecto del número de explantes por frasco en la tasa de multiplicación.
3. Estudiar la respuesta del cultivar Masaya a la técnica de inmersión temporal.
4. Aplicar el proceso embriogénesis indirecta en el cultivar Masaya.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

La micropropagación es el proceso que permite la obtención de plantas *in vitro* a partir de un fragmento de una planta madre en condiciones de asepsia. Según Orellana (1998), este proceso incluye varias fases:

Fase 0: Preparación de la planta madre.

Fase 1: Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia.

Fase 2: Multiplicación de brotes.

Fase 3: Enraizamiento.

Fase 4: Aclimatización.

Según Deberh y Maene (1981), citado por Orellana (1998), la fase 0 es una etapa importante o indispensable en la micropropagación, ya que en esta fase se selecciona la planta donadora de los explantes y se determinan todas las condiciones, para el posterior establecimiento de los mismos. El propósito principal de la fase 1 es lograr un cultivo aséptico y viable, incluye la selección del explante adecuado y su desinfección, así como su sobrevivencia. La fase 2 involucra un número determinado de subcultivos, con el fin de incrementar el número de brotes por plantas, que darán lugar a la formación de una nueva planta. La fase 3 es necesaria para el enraizamiento individual de los brotes, el incremento de su resistencia al estrés hídrico y enfermedades, para el establecimiento de las reservas de alimentos necesarios en el periodo de transición y para el desarrollo de la capacidad autotrófica. Según Novak (1980), la fase 4 es de gran importancia, ya que en ella se realiza el trasplante de las plántulas al suelo y su posterior adaptación al medio ambiente. Esta fase permite que las plantas desarrollen un sistema radical bien desarrollado y una alta humedad necesaria para su protección lo que evita su desecación en los días posteriores al trasplante al suelo, logrando así un alto índice de sobrevivencia.

Según Altamirano & Acuña (2000), las técnicas de cultivo *in vitro* permiten el reemplazo del proceso sexual y la propagación vegetativa no aséptica. Además, son una

alternativa que permite mejorar no solo la calidad genética, fisiológica y fitosanitaria de un gran número de especies vegetales, sino también son fundamentales en el proceso de transformación genética de plantas ya sea mediante las rutas organogénicas o embriogénicas que son los principales métodos de regeneración *in vitro* de plantas.

En quequisque, Nyochembeng y Garton (1998) y Gupta (1985), atribuyen la regeneración de planta de quequisque a partir de callos o procesos organogénicos, mientras que Dottin (2000), considera que es debido a procesos de embriogénesis somática.

La organogénesis es el proceso por el que células y tejidos son forzados a sufrir una serie de cambios que tiene como resultado final una estructura unipolar, ya sea un primordio de brote o de raíz cuyo sistema vascular está a menudo conectado con el tejido madre (Pliego & Barceló, 2001), mientras que la embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula, sin la necesidad de la fusión de gametos. Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y no poseen conexión vascular con el tejido materno. Estas estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales (Tisserat *et al*; 1979).

## **2.1 Organogénesis**

Litz y Jarrete (1991), clasifican la organogénesis en directa e indirecta, es directa cuando los brotes se forman del explante y es indirecta cuando se forman a partir de callos. Jiménez (1998), afirma que la organogénesis puede hacerse por dos vías: la formación de yemas axilares y yemas adventicias.

Orellana (1998), afirma que con la micropropagación vía organogénesis utilizando yemas axilares se ha demostrado en muchas especies como el método mas confiable para lograr un proceso repetible sin alteraciones genéticas y libres de contaminantes

Thorpe (1980), menciona que el proceso de organogénesis comprende la diferenciación e interacción celular y la reacción a señales específicas.

Murashige (1974), recomienda tomar en cuenta diferentes factores entre ellos la procedencia del explante, edad fisiológica y tamaño del explante para poder aplicar la organogénesis de una manera exitosa.

Skoog y Miller (1957), descubrieron que el desarrollo organizado ocurre como resultado de la interacción cuantitativa entre auxinas-citoquininas y otros factores. Se ha demostrado en muchos cultivos la importancia que juegan los reguladores de crecimiento en la iniciación y la regulación del desarrollo organizado. Por tanto un balance apropiado entre auxinas y citoquinina en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemas, ápices y yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquinina presentes en el explantes, las cuales depende de la especie y tipo de explantes.

Diferentes autores reportados por Caldera y López (2002), afirman que a mayor densidad de siembra de los explantes en los frascos, produce mayor cantidad de brotes y raíces, debido posiblemente a que los explantes difunden auxinas y citoquininas.

Dottin (2000), reporta que Redway (1996), logró la proliferación axilar en quequisque con el empleo del medio MS y 20% de agua de coco. Mientras Thorpe (1991), lo logró cuando utilizó un medio MS, suplementado con 3.0 y 5.0 mg/l .de BAP como regulador de crecimiento.

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

Teisson y Alvard (1994), describieron un sistema de propagación a gran escala denominada Recipientes de Inmersión Temporal Automatizada (RITA) este sistema ha

sido probado con éxito en embriogénesis y organogénesis para propagación en diferentes especies como banano, café, caucho y caña de azúcar.

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

## **2.2 Embriogénesis somática**

Los embriones somáticos son estructuras bipolares, que tienen un eje radial, aislados por un tejido epidérmico y no poseen conexión vascular con el tejido materno. De acuerdo con Lindsey y Jones (1992), los embriones somáticos pueden desarrollarse y germinar de modo análogo a la germinación de los embriones cigóticos, a partir de células, tejidos u órganos.

Similar a la organogénesis, la embriogénesis somática muchos autores la clasifican en directa e indirecta. La embriogénesis somática es directa cuando el desarrollo de los embriones se produce a partir de células somáticas del explante original, puede utilizarse para la micropropagación de un número limitado de especies, y es indirecta cuando el desarrollo del embrión es a partir de callo o suspensiones celulares. Los embriones somáticos se pueden obtener de varias fuentes de tejidos tales como: hojas jóvenes, hojas inmaduras, inflorescencias, pecíolos, etc. (Gómez, 1998).

Gómez (1998), señala que Fujimura y Komamine (1980), describen cuatro fases de detalles morfológicos en la embriogénesis somática de zanahoria, fases 0 ,1 ,2 ,3. En la fase 0 la célula aislada por continuas divisiones forma los agregados celulares embriogénicos, con la presencia de auxina en el medio de cultivo. En la fase 1, es inducida por la transferencia de los agregados celulares a un medio libre de auxinas, es una fase relativamente lenta y aparentemente sin diferenciación en los 3 primeros días.

La fase 2, ocurre una división celular rápida a los 4 días del cultivo, en ciertas partes del agregado celular, dando lugar a la formación del embrión en estado globular. En la fase 3, se produce el continuo desarrollo del embrión al estado corazón y torpedo.

Pliego y Barceló (2001), describen 2 fases en el proceso de embriogénesis somática, en la fase 1 tiene lugar cuando en presencia de auxina, se forman masas de células proembriónicas a partir de células competentes presentes en el explante; en la fase 2 se hace la transferencia de los explantes a medios sin auxinas, hay una aceleración del crecimiento, debida a la división activa de los agregados que contienen células con citoplasma muy denso.

En el caso de las especies monocotiledóneas se reconocen únicamente las fases 0, 1 y 2, porque no se diferencian los estados corazón y torpedo, sino que el embrión globular sufre un proceso de transición, que se prolonga hasta llegar a formar el embrión maduro. Las auxinas son consideradas como el factor más fuerte asociado con la continua proliferación de células embriogénicas; sin embargo, parece ser que la auxina está relacionada a la reducción de la concentración de nitrógeno, existiendo entre ellos una aparente interacción. (Villalobos *et al.*, 1991).

Muchos autores, mencionados por Gómez (1998), establecen una fuerte correlación entre el estado de desarrollo del explante inicial y la concentración de 2,4-D en el proceso de desdiferenciación y de diferenciación *in vitro*.

La generación de plántulas a partir de células, tanto por embriogénesis somática directa como indirecta, es una oportunidad para obtener altos niveles de fidelidad genética, porque permite seleccionar las deseables desde muy temprano, en caso de que haya una respuesta bastante uniforme (Krikorian, 1991).

Merkle *et al.*; (1966), destacan que la aplicación de la embriogénesis somática en la propagación masiva y en la transferencia de genes, es la habilidad de los cultivos embriogénicos de muchas especies de plantas a multiplicarse indefinidamente.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

El presente estudio se realizó entre los meses comprendidos de junio de 2004 a mayo de 2005, en el laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales del Programa Recursos Genéticos Nicaragüense (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria, ubicada en el km. 12 ½ carretera norte, Managua. Geográficamente se ubica a 12°08` latitud norte y 86°10` longitud oeste con una altitud de 56 msnm.

#### **3.1 Organogénesis directa**

Se estudió el proceso de organogénesis directa en quequisque morado, cultivar Masaya con ápices extraídos del cormo de plantas madres en estado adulto o yema terminal y ápices extraídos de plantas en estado juvenil (yema axilar o de rebrote) en las fases de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatización. En los diferentes experimentos se utilizó como medio de cultivo las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS, 1962) (Anexo 2) y se definieron las concentraciones hormonales de auxinas y de citoquininas de acuerdo a la correspondiente fase de estudio.

##### **3.1.1 Esterilización de materiales y equipo**

Los materiales y equipos utilizados se detallan en anexo 1.

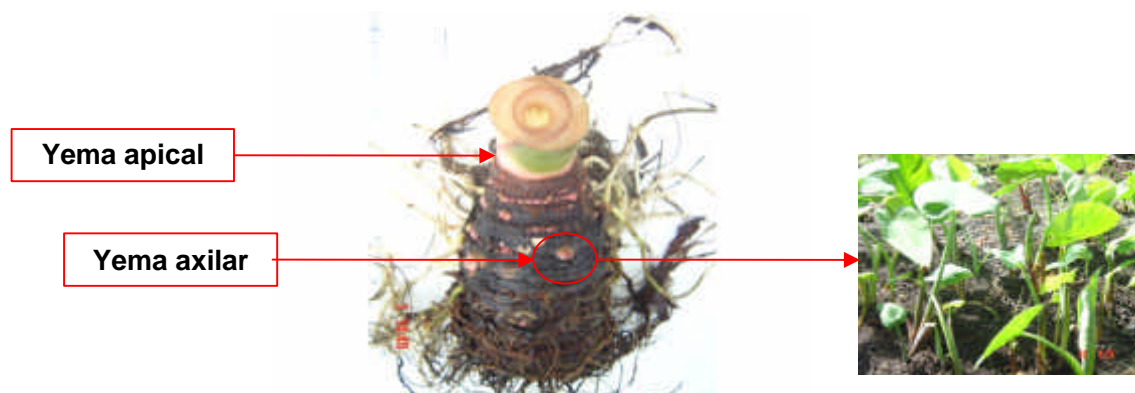
Previo al establecimiento de los diferentes experimentos se realizó el lavado y esterilización de la cristalería y de instrumentos necesarios para la manipulación de los tejidos. Los tubos de ensayo se introdujeron en cloro al 2 % durante dos horas, posteriormente se lavaron con detergente y enjuagados con abundante agua, además los contenedores RITA después de ser lavados y enjuagados fueron esterilizados en el autoclave a una presión de 1 atmósfera y temperatura de 121 °C. De igual manera los medios de cultivos utilizados en cada fase, una vez preparado y distribuido en los contenedores correspondientes, fueron esterilizados en el autoclave a la misma temperatura y presión. Los instrumentos se esterilizaron en horno a temperatura de 170 °C durante una hora. El interior de la cámara de flujo laminar se limpió con alcohol al 70%, y previo a la siembra de los explantes se esterilizó con luz ultravioleta durante 30

minutos. Este procedimiento se realizó para garantizar la eliminación de microorganismos contaminantes en los materiales y equipos.

### 3.1.2 Fase de establecimiento

#### 3.1.2.1 Extracción de ápices

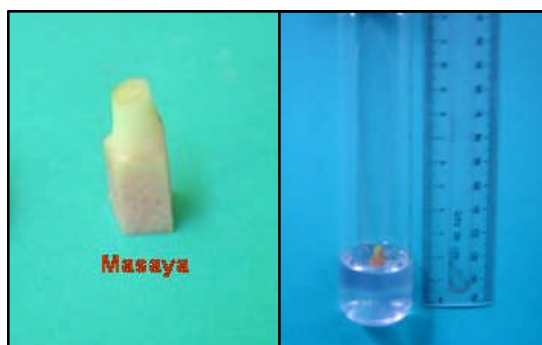
Se seleccionaron yemas apicales (terminales) y yemas axilares de cormos de quequisque, a como se muestra en la figura 1. Las yemas apicales se extrajeron y se redujeron con cuchillo a un tamaño de aproximadamente 2 cm de largo y 1 cm de ancho, una vez extraídos los explantes se procedió a lavar los tejidos con agua y detergente durante 30 minutos, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5 % durante 10 minutos, y para eliminar los residuos de cloro se efectúan tres enjuagues continuos con agua destilada estéril.



**Figura 1.** Cormo madre con yema apical y yemas axilares

Las yemas axilares se indujeron a brotación, para ello se sembraron en canteros conteniendo sustrato de arena como se muestra en la figura 1 manteniéndose con alto nivel de humedad; una vez brotadas y habiendo obtenido una altura promedio de 20-25 cm, 45 días después se extrajeron las yemas apicales con un tamaño de 2 cm de largo y 1 cm de ancho, se procedió con el mismo proceso de limpieza y desinfección efectuado a las yemas apicales de plantas adultas. Los dos tipos de materiales seleccionados fueron llevados a la cámara de flujo laminar en el cuarto de transferencia; una vez en la cámara de flujo laminar se realizó una segunda desinfección con hipoclorito de sodio al 2 %

durante 5 minutos, los residuos se eliminaron con el mismo procedimiento de la primera desinfección, allí mismo los ápices extraídos fueron puesto en placas petri y con la ayuda de escalpelos y pinzas se redujo a un tamaño aun más pequeño, aproximadamente 0.5 cm de alto y 0.5 cm de ancho, para luego ser sembradas individualmente con todas las condiciones asépticas en los correspondientes contenedores. Los tejidos se establecieron en tubos de ensayo de 150 x 25 mm conteniendo 10 ml de medio de cultivo semi-sólido a como se muestra en la figura 2. Finalizada la siembra de los explantes, se sellaron los tubos de ensayo con cinta plástica transparente. Posteriormente los tejidos fueron trasladados al cuarto de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas de temperatura de  $27 \pm 1$  °C, intensidad de luz de 2000 lux, 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.



**Figura 2.** Tamaño de tejido utilizado en fase de establecimiento.

### 3.1.2.2 Medios de cultivo

En las diferentes fases del estudio de organogénesis los medios de cultivos se prepararon de acuerdo a los protocolos descritos para el cultivo de quequisque (Anexo 2).

Los medios utilizados para esta fase se muestran en la tabla 1. Una vez preparadas las diferentes variantes de medios de cultivos, se adicionó el gelificante Phytigel (Sigma) a razón de 3 g/l. Se ajustó el pH a 5.8 con NaOH 1N ó HCl 1N y se distribuyeron 10 ml de medio de cultivo por tubo de ensayo cuyas dimensiones son de 2.5 x 15 cm.





- Número de hojas
- Altura de brotes axilares: escala 1 (1- 3 mm) 2 (4- 6 mm) 3 (> 6 mm).
- Número brotes axilares

### 3.1.3 Fase de multiplicación

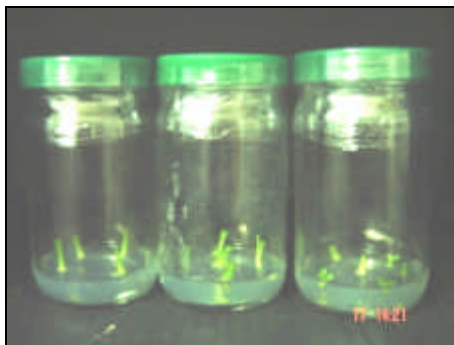
#### 3.1.3.1 Selección del medio de cultivo

Para definir el mejor medio de cultivo en la fase de multiplicación utilizando tejido tanto de yemas apicales como de rebrotes, se estudiaron 12 variantes de medios de cultivo durante 3 subcultivos sucesivos. Ver tabla 2.

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

Medio de cultivo MS (1962)	Reguladores de crecimiento	
	AIA (mg /l)	BAP ( mg/l)
1	0.0	0
2	0.25	0
3	0.50	0
4	0.00	1
5	0.25	1
6	0.50	1
7	0.0	2
8	0.25	2
9	0.50	2
10	0.0	3
11	0.25	3
12	0.50	3

Para el estudio se tomaron 20 plantas formadas en la fase de establecimiento y se les eliminaron hojas, brotes axilares y raíces, reduciendo los explantes a un tamaño aproximado de 1 cm, seguidamente en la cámara de crecimiento éstos se inocularon en frascos de 250 ml que contenían 25 ml de medio de cultivo semi-sólido (Figura 3). Finalizada la siembra de los explantes, los frascos se sellaron con cinta parafinada y después fueron llevados al cuarto de crecimiento teniendo las mismas condiciones de temperatura y de intensidad de luz que la fase de establecimiento.



**Figura 3.** Frascos utilizados en fase de multiplicación.

### **3.1.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico**

Los ensayos se organizaron en un diseño estadístico de bloque completo al azar (BCA) cada tratamiento conformado por 5 repeticiones (5 frascos con capacidad de 250 ml). En cada contenedor se colocaron 4 explantes, constituyéndose unidades experimentales de 20 plantas por variante de medio de cultivo. Para el análisis estadístico primero se realizó una prueba de varianza de clasificación doble (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller ( $\alpha=0.05$ ). Únicamente para el número de raíces, se realizó la prueba no paramétrica de Chi - cuadrado ( $\chi^2$ ).

### **3.1.3.3 Variables evaluadas**

A las 4 semanas se evaluaron las siguientes variables:

- a-** Número de brotes producido por explante
- b-** Longitud de explante y de brotes
- c-** Número de hojas
- d-** Número de raíces por planta

### **3.1.4 Fase de enraizamiento**

En esta fase es necesario que las plantas próximas a ser adaptadas a las condiciones ambientales, tengan suficientes raíces que las preparen a las nuevas condiciones, donde

a diferencia del medio de cultivo, las plantas tienen que absorber el agua y los nutrientes del sustrato.

### 3.1.4.1 Medios de cultivo

Con plantas formadas de las dos fuentes de material vegetativo del cultivar, se procedió a evaluar el efecto en la producción de raíces de 3 medios en consistencia semi-sólida y líquida. En la tabla 3 se presentan los medios correspondientes.

**Tabla 3.** Concentraciones de sales y de ácido indolacético (AIA) en la fase de enraizamiento.

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

### 3.1.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico

Para el estudio de la fase de enraizamiento se utilizó un diseño estadístico bifactorial en BCA. El análisis estadístico empleado es el mismo utilizado en la fase de multiplicación.

A las cuatro semanas se evaluaron las siguientes variables:

- a- Número de hojas
- b- Longitud de planta
- c- Número de raíces por planta

### 3.1.5 Fase de aclimatización

Esta fase es la más importante para la micropropagación, ya que tiene como objetivo lograr la adaptación de las plantas, previamente enraizadas, al medio ambiente externo. Para la respuesta a la aclimatización del cultivar se tomaron plantas formadas en los tres tipos de medios de cultivos y dos consistencias de los mismos en la fase de enraizamiento.

La aclimatación de estas plantas se realizó en un sombreadero cubierto con malla plástica (sarán) que reduce la intensidad luminosa al 60%. Las plantas se sembraron en bolsas de polietileno con dimensiones de 4" x 8" en sustrato orgánico humus de lombriz. Para garantizar una humedad relativa del 80 %, se les suministró riego por micro nebulizadores durante 10 minutos 2 veces al día.

### **3.1.5.1 Variables evaluadas y análisis estadístico**

Se utilizó un diseño bifactorial BCA. Cada tratamiento conformado por 20 plantas. El análisis estadístico fue similar al empleado en la fase de multiplicación. Evaluándose a los 45 días de haber sido establecida, las siguientes variables:

- a- Supervivencia
- b- Número de hojas
- c- Longitud de planta
- d- Diámetro de pseudotallo

### **3.1.6 Efecto del número de explantes por contenedor**

Se estudió el efecto en la brotación axilar que produce el número de explantes por contenedor (utilizando 4, 5 y 6 explantes por contenedor). Se seleccionaron las variantes de medio de cultivo de acuerdo a los mejores resultados obtenidos en el experimento 3.1.3.1 de la fase de multiplicación que fue de 1 mg/l de AIA y 2 mg/l de BAP. El diseño, el análisis estadístico y las variables a evaluar fueron similares a la sección 3.1.3.2 y 3.1.3.3 de la misma fase.

### **3.1.7 Inmersión temporal**

En el estudio de inmersión temporal se empleó la metodología desarrollada por Escalona *et al*; (1999) reportada por Dottin (2000). Se utilizaron contenedores conocidos como Recipientes de Inmersión Temporal Automática (RITA) con capacidad de 500 ml, fabricados por la empresa Nalgene. (Figura 4). El sistema consiste en un recipiente plástico que contiene en su interior una pieza dividida en dos compartimentos. En el fondo de la cámara superior se colocaron los explantes sobre una malla para impedir que

los callos, embriones o tejidos pasen al aparte inferior y en la cámara inferior se deposita el medio de cultivo. Este sistema además, cuenta con dos filtros hidrófobos de 0.2 $\mu$ m reutilizables: uno central (entrada de aire) y uno lateral (salida de aire). El filtro central se conecta al sistema de aireación (bomba) a una presión de salida de 0.2 bar para que impulse el medio de la cámara inferior a la superior durante un periodo corto (periodo de inmersión). Este baño temporal que recibieron los explantes se controla por un reloj temporizador (automatización) que permite la abertura de un electro-válvula que controla el sistema. Para el estudio se tomaron plantas formadas de yemas apicales y axilares en la fase de multiplicación y se les eliminaron hojas, brotes axilares y raíces, reduciendo los explantes a un tamaño aproximado de 1 cm. Se empleó el medio de cultivo constituido por las sales y vitaminas MS (1962) con 2 mg/l de BAP ajustándose el pH a 5.8. Se adicionaron 200 ml de medio líquido por contenedor y se colocaron en estantes con fotoperíodos de 16 horas luz, 8 horas de oscuridad a una temperatura de 27  $\pm$  1° C y dos frecuencias de inmersiones diarias: dos inmersiones por día de 7 minutos cada 12 horas y tres inmersiones diarias de 7 minutos cada 8 horas.



**Figura 4.** Contenedor de inmersión temporal (RITA).

### **3.1.7.1 Diseño experimental y análisis estadístico**

Se utilizaron tres Ritas por tratamiento conteniendo cada uno 10 explantes por cada fuente de tejidos. El diseño y análisis estadístico fue similar al empleado en la fase de multiplicación.

### **3.1.7.2 Variables evaluadas**

A las tres semanas se evaluaron las siguientes variables:

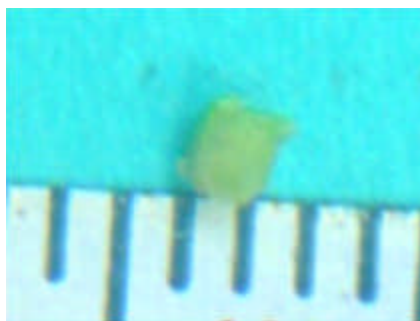
- a- Número de brotes producido por explante
- b- Longitud de explantes y de brotes
- c- Número de hojas
- d- Número de raíces por planta

### **3.2 Embriogénesis indirecta**

El material vegetativo que se utilizó en la embriogénesis indirecta fue tomada de plantas ya establecidas *in vitro* provenientes del proceso de organogénesis directa. Se llevaron a cabo las fases de iniciación o inducción de callos, multiplicación de callos, formación de embriones somáticos, maduración de embriones somáticos y germinación de embriones somáticos, como también su posterior enraizamiento y aclimatización. En los diferentes experimentos se definieron las concentraciones hormonales de acuerdo a la correspondiente fase de estudio. Se utilizó como medio de cultivo base las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS, 1962).

#### **3.2.1 Fase de inducción de callos**

Para la inducción de callos se tomaron plantas *in vitro* procedentes de la fase de multiplicación para facilitar la manipulación y observación se hizo uso de estereoscopio con un lente objetivo de 10x, y se extrajeron ápices meristemáticos de aproximadamente 1.5 mm de tamaño (Figura 5) y se sembraron en medios de cultivo de consistencia sólida en frascos de 200 ml de capacidad, en número de 4 ápices por contenedor y cinco contenedores conteniendo 20 ápices por variante de medio de cultivo. El pH de los medios se fijó en 5.8. Una vez establecidos en las diferentes variantes de medios de cultivo se trasladaron al cuarto de crecimiento a condiciones de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, a temperaturas de 27 +/- 1 ° C.



**Figura 5.** Ápice meristemático, escala de 1 mm.

Para la fase de inducción de callo se utilizaron dos sustancias reguladoras del crecimiento: auxinas el ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2- 4, D) en concentraciones de 1.0, 2.0 y 3.0 mg/l y ácido indolbutírico (IBA) citoquinina, 6-bencilaminopurina (BAP). En la tabla 4 se detallan las variantes utilizadas.

**Tabla 4.** Variantes de medios de cultivos utilizados en la fase de inducción de callos.

Variante de medio de cultivo	Reguladores de crecimiento			
	Sales MS 1962 (%)	2,4-D (mg /l)	BAP ( mg/l)	IBA ( mg/l)
MS (1962)				
1	50	1	0	0
2	50	2	0	0
3	50	3	0	0
4	50	0.0	0.2	2
5	100	1	0	0
6	100	2	0	0
7	100	3	0	0
8	100	0.0	0.2	2

### 3.2.1.1 Variables evaluadas y análisis estadístico

A las cuatro semanas se evaluaron las siguientes variables: formación de planta, número de callo con raíces y formación de callos friables y acuosos. Para la determinación del mejor tratamiento, en las variables formación de callos, formación de plantas y explantes con raíces, se obtuvieron porcentajes y el error estándar.



### 3.2.2 Fase de multiplicación de callos

Se procedió a la multiplicación de callos después de permanecer en fase de inducción por 60 días, se transfirieron a variantes de medios de cultivo basados a los resultados obtenidos por Dottin (2000) y Gupta (1985). Ver tabla 5. En frascos de 200 ml de capacidad conteniendo medios de cultivo de consistencia sólida. Se seccionaron callos friables con peso de 100 a 150 mg aproximadamente, sembrándose cuatro callos por contenedor y cinco contenedores por variante de medio de cultivo. El pH de los medios se fijó en 5.8. Una vez establecidos en las diferentes variantes de medios de cultivo se trasladaron al cuarto de crecimiento a temperaturas de 27 +/- 1 °C y permaneciendo en oscuridad durante 30 días.

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

<b>Autores</b>	<b>Agua de coco (%)</b>	<b>Kinetina (mg/l)</b>	<b>ANA (mg/l)</b>
Dottin (2000)	5	0.4	0.0
Dottin (2000)	10	0.4	0.0
Gupta (1985)	0	2	0.2
Gupta (1985)	0	2	2

ANA = ácido naftanaldehído.

#### 3.2.2.1 Variables evaluadas y análisis estadístico

Se evaluó el volumen de crecimiento de los callos en porcentaje, conforme a las escalas propuestas por Santana (1982) en las que se establecieron 5 escalas, (Tabla 6). Para la determinación del mejor tratamiento se realizó el porcentaje más el error estándar de cada escala.

**Tabla 6.** Variables evaluadas en la fase de multiplicación de callos.

<b>Escala propuesta por Santana (1982)</b>
1 Callo muerto
2 Callo vivo pero sin crecimiento
3 Callo vivo y con pequeños puntos de crecimiento
4 Callo creciendo en el 50% de su volumen
5 Callo creciendo en el 100% de su volumen

### 3.2.3 Fase de formación de embriones somáticos

Para la fase de formación de embriones somáticos se tomaron callos friables formados en la fase de multiplicación. Se estudiaron cuatro niveles de AIA (0.0, 20, 25 y 30 mg/l) en combinación con 50 g de sacarosa (Tabla 7). El volumen y número de tejidos sembrados por frasco, así como las condiciones ambientales fueron similares a las descritas en la sección 3.2.2.

**Tabla 7.** Variantes de medios de cultivos en la fase de formación de embriones.

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

#### 3.2.3.1 Variables evaluadas y análisis estadístico

A las cuatro semanas se evaluaron las siguientes variables:

- Porcentaje de callos con embriones globulares
- Número de embriones globulares
- Porcentaje de callos con raíces

El número de embriones globulares se contabilizó con ayuda de un estereoscopio. Para determinar el mejor tratamiento, en las variables callos con embriones globulares y callos con raíces se obtuvo el porcentaje y el error estándar de cada tratamiento y para la variable número de embriones globulares se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con  $\alpha = 0.05$ . Se utilizó un diseño BCA.

#### 3.2.4 Fase de maduración de embriones somáticos

Para facilitar la maduración de los embriones somáticos se seleccionaron embriones en etapa globular obtenidos en el experimento descrito en la sección 3.2.3. Se utilizaron el mismo tipo de contenedor, la consistencia y pH de los medios de cultivo, número de

callos por contenedor y condiciones ambientales descritas en la sección 3.2.2. Las variantes de medios de cultivo se seleccionaron de acuerdo a los resultados obtenidos por García (1997), Szabados *et al.*, (1987) y Bancroft (1998). (Tabla 8).

**Tabla 8.** Variantes de medios de cultivos en la fase de maduración de embriones.

<b>Autores</b>	<b>2,4-D (mg/l)</b>	<b>AIA (mg/l)</b>	<b>BAP (mg/l)</b>
García, (1997)	0.0	0.0	0.0
(Szabados <i>et al.</i> , 1987)	0.01	0.0	0.1
Bancroft (1998)	0.0	0.1	0.1

### **3.2.4.1 Variables evaluadas y análisis estadístico**

Las evaluaciones se realizaron a las cuatro semanas, de acuerdo a las siguientes variables: número de embriones globulares por callo, número de embriones maduros, porcentaje de callos con raíces. El número de embriones globulares y maduros se contabilizó con ayuda de un estereoscopio. Para determinar el mejor tratamiento, se obtuvo el porcentaje y el error estándar de la variable callos con raíces, y para las variables número de embriones globulares y número de embriones maduros se realizó la prueba de rasgos múltiples de Duncan y Waller con  $\alpha = 0.05$ . Se sembraron 4 explantes por contenedor y se emplearon 5 contenedores por tratamiento y para cada fuente de tejido. Se utilizó un diseño BCA.

### **3.2.5 Fase de germinación de embriones**

Se utilizaron embriones maduros, obtenidos en el experimento descrito en la sección 3.2.4, estas se dividieron en segmentos de 0.5 cm. Las variantes de medios de cultivos utilizados se describen en la tabla 9.

Se utilizó el mismo tipo de contenedor, consistencia y pH de los medios de cultivo, número de callos embriogénicos por contenedor y condiciones ambientales descritas en la sección 3.2.1.

**Tabla 9.** Variantes de medio de cultivo empleado en la fase de germinación de embriones.

<b>Variante de Medio de cultivo</b>	<b>BAP (mg / l)</b>	<b>Sacarosa (g / l)</b>
1	0.0	30
2	0.1	30
3	0.2	30
4	0.3	30

### **3.2.5.1 Variables evaluadas y análisis estadístico**

A las cuatro semanas se realizaron las evaluaciones en base a las variables: Porcentaje de plantas germinadas y número de plantas. Para determinar el mejor tratamiento se obtuvo el porcentaje y el error estándar de la variable plantas germinadas y en la variable número de plantas, la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con  $\alpha = 0.05$ . Se utilizó un diseño BCA.

### **3.2.6 Enraizamiento**

En esta fase se seleccionaron plantas provenientes de la germinación de embriones maduros y fueron sembradas en número de cinco plantas por frascos a los que se les agregaron 20 ml de medio de cultivo, en el experimento se utilizaron cuatro frascos. Las plantas permanecieron durante 30 días en el medio de consistencia sólida que contenía el 100% y 1 mg/l de AIA.

Para estudiar la respuesta al enraizamiento se evaluaron a los cuarenta días las variables longitud de plantas, número de hojas, número de raíces y número de brotes promedios.

### **3.2.7 Aclimatización**

Plantas procedentes de la fase de enraizamiento, sección 3.2.6, fueron trasladadas a condiciones de sombreadero. Las condiciones de aclimatización fueron similares a las descritas en la sección 3.2.7. A las cuatro semanas de aclimatizadas se evaluó un total de veinte plantas, en las siguientes variables:

- ‡ Porcentaje de sobrevivencia
- ‡ Longitud de planta
- ‡ Número de hojas
- ‡ Diámetro de pseudotallo

## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Organogénesis directa**

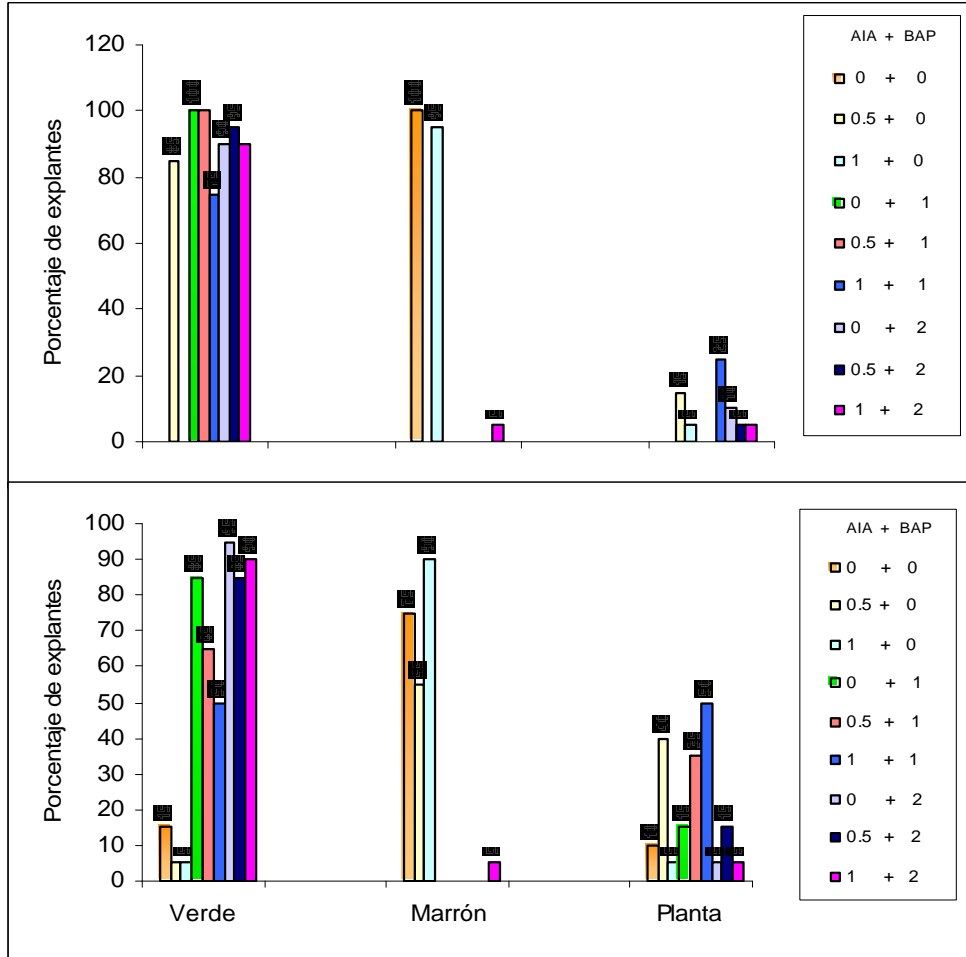
#### **4.1.2 Fase de establecimiento**

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

El estado fisiológico de la planta que dona el explante es de gran influencia en la respuesta de los tejidos en cultivo, existiendo diferencias en los requerimientos nutricionales y hormonales, cuando los tejidos provienen de plantas con diferentes edades fisiológicas (Jiménez, 1998).

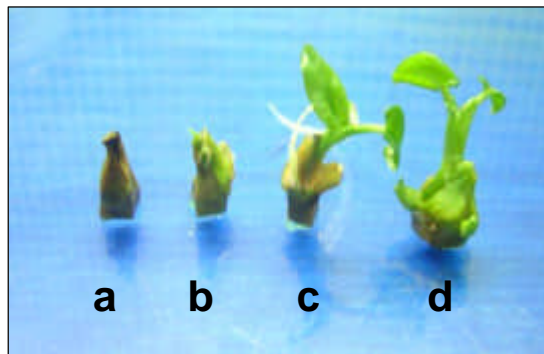
##### **4.1.2.1 Ápices de yemas terminales**

Se observó que los explantes a los 30 y 45 días de establecidos en medios de cultivo a los que no se les adicionó BAP favoreció la expresión del color marrón en la epidermis, síntoma del efecto reductor del crecimiento que se produce en los explantes por la carencia de citoquininas en los medios de cultivo. Los tejidos mostraron color verde en los medios a los que se les adicionó AIA solo o en combinación con BAP. El mayor porcentaje de formación de plantas se alcanzó en el medio suplementado con 1 mg/l de AIA y 1 mg/l de BAP en el 25 % de los explantes, llegando hasta un 50% a los 45 días. (Figura 6).



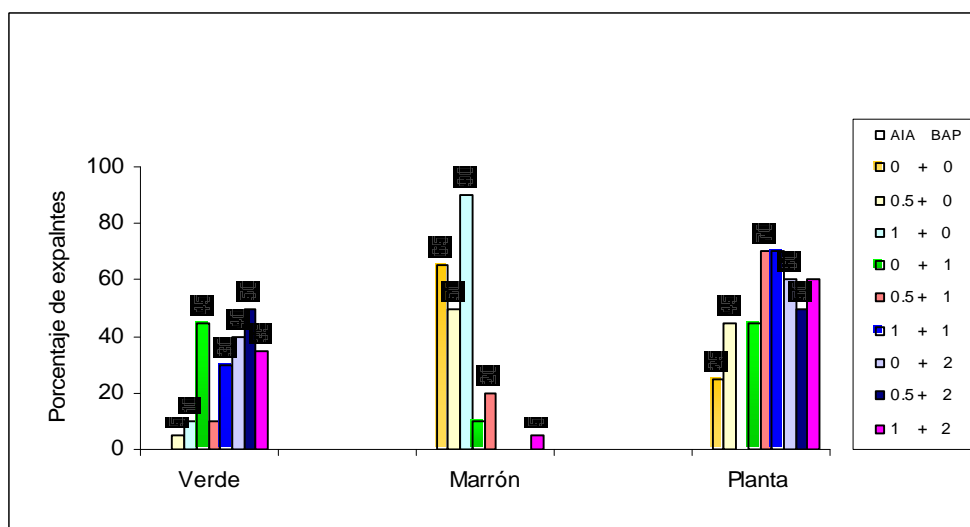
**Figura 6.** Porcentajes de color verde, color marrón y planta formada en ápices terminales del cultivar Masaya. Arriba a los 30 días, abajo a los 45 días de establecidos en nueve variantes de medios de cultivo.

En la figura 7 se aprecia la dinámica de crecimiento de los ápices del cultivar Masaya.



**Figura 7.** Dinámica de diferenciación de ápices terminales y axilares del cultivar Masaya en fase de establecimiento: de izquierda a derecha: (a) ápice color marrón (b) ápice color verde (c) planta formada (d) planta formada y con brote.

A los 60 días los ápices que presentaron el mayor porcentaje de color marrón fueron los establecidos en los medios que no se les adicionó BAP, registrando un rango porcentual entre el 50 y el 95%. En los medios que contenían 0, 0.5 y 1 mg/l de AIA combinado con 1-2 mg/l de BAP se presentó menor porcentaje de ápices de color marrón y pero mayor porcentaje de plantas formadas, sobresaliendo los explantes establecidos en el medio que se le adicionó 1 mg/l de AIA y 1 mg/l de BAP (30 % color verde y 70 % de plantas formadas). (Figura 8).



**Figura 8.** Porcentajes de color verde, color marrón y planta formada en ápices de yemas terminales del cultivar Masaya a los 60 días de establecidos en nueve variantes de medios de cultivo.

De acuerdo a la respuesta de los ápices en las variantes de medios de cultivo, se demostró que éstos respondieron mejor con la adición de BAP solo o en combinación con la auxina AIA, siendo el objetivo principal la formación de plantas en la fases de establecimiento, esta se favorece con adición de 1 mg/l de AIA solo o en combinación con el BAP, como se aprecia en la figura 8. La respuesta del cultivar Masaya al AIA y al BAP coincide con lo afirmado por George (1993), en que estas sustancias hormonales son las más importantes para regular el crecimiento y la morfogénesis en tejidos de plantas y cultivo de órganos.

En la evaluación de las variables longitud de planta y número de hojas, el tratamiento número 7 con valores promedios de 1.86 cm de longitud y 4.50 hojas respectivamente,

superó estadísticamente a los demás tratamientos. En los medios que no contenían BAP, no se estimuló brotación axilar. Con concentración de 2 mg/l de BAP y sin auxina fue mejor el porcentaje de plantas que presentaron mayor longitud de brotes, aunque de acuerdo a  $\chi^2$  los tratamientos los mejores medios de cultivo 4, 6, 7, 8 y 9 fueron estadísticamente similares entre sí. Tabla.10.

**Tabla 10.** Longitud de plantas, número de hojas y longitud de brotes a los 60 días de establecidos, ápices de yemas terminales del cultivar Masaya.

Nº de trat.	AIA - BAP (mg/l)		Longitud de planta (cm)	Número de hojas	(% Longitud de brotes (escala en mm))				? <sup>2</sup>
	0	0.5			0	1	2	3	
1	0	0	0.715 bc	0.400 d	100	0	0	0	b
2	0.5	0	0.640 c	0.300 d	100	0	0	0	b
3	1	0	0.825 bc	0.650 d	100	0	0	0	b
4	0	1	0.760 bc	2.500 c	35	60	5	0	a
5	0.5	1	0.700 bc	3.500 abc	55	45	0	0	b
6	1	1	0.870 bc	3.050 bc	25	75	0	0	a
7	0	2	1.865 a	4.500 a	10	75	15	0	a
8	0.5	2	1.145 b	2.500 c	25	65	10	0	a
9	1	2	1.035 bc	3.750 ab	40	60	0	0	a

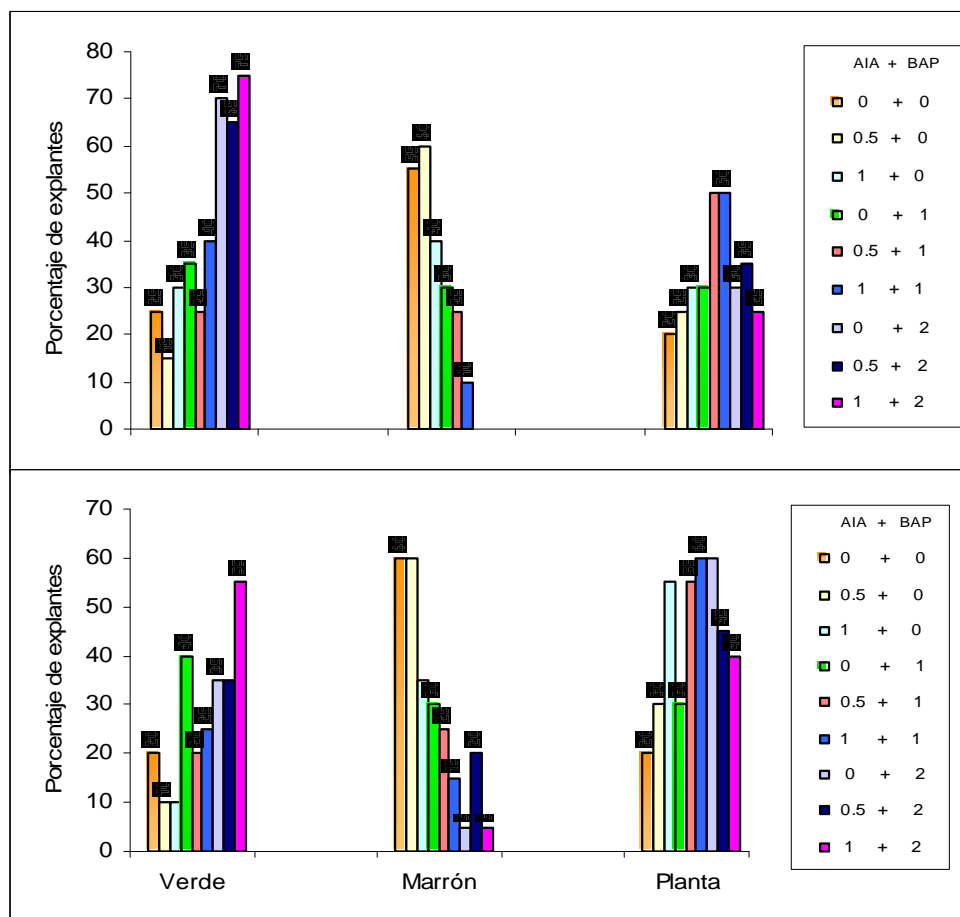
Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller como para  $\chi^2$  con  $\alpha = 0.05$ .

#### 4.1.2.2. Ápices de yemas axilares

A los 30 días no se presentó el color marrón en los explantes establecidos en los medios que contenían las concentraciones 0, 0.5 y 1mg/l de AIA combinado con dosis de 2 mg/l de BAP, aunque a los 45 días se presentó reducidamente en el 20% de los explantes. A los 30 días los mayores porcentajes de color marrón se presentaron en el medio que no se adicionó BAP, expresándose hasta en un 60% en el medio suplementado con 0.5 mg/l de AIA y a los 45 días en los medios suplementados con auxinas combinados con 1 y 2 mg/l de AIA presentaron mayor formación de plantas hasta un 60% a los 45 días, de igual manera el mayor porcentaje de explantes sin crecimiento pero de color verde en los medios suplementados con 2 mg/l de BAP con o sin AIA. Sin embargo, la relación de la expresión menor porcentaje de explantes color marrón y mayor porcentaje de plantas



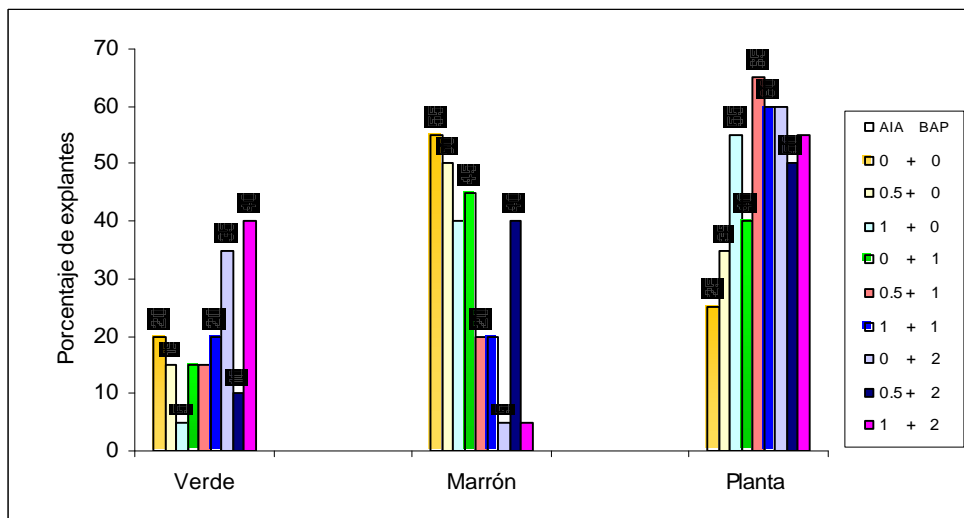
formadas, se logró en los medios suplementados con 1 mg/l de AIA con 1 mg/l de BAP a los 30 días y sin adición de AIA con 2 mg/l de BAP a los 45 días Figura 9.



**Figura 9.** Porcentajes de color verde, color marrón y planta formada en ápices axilares del cultivar Masaya. Arriba a los 30 días, abajo a los 45 días de establecidos en nueve variantes de medios de cultivo.

Un porcentaje de 65% plantas formadas se produjo a los 60 días en el medio suplementado con 0.5 de AIA y 1 mg/l de BAP; el color marrón se presentó principalmente en los medios que no se les adicionó BAP (55, 50 y 40%) mientras que el color verde se observó en mayor porcentaje en los medios con 0 y 1 mg/l de AIA ambos con 2 mg/l de BAP con porcentajes respectivos de 35 y 40%.

(Figura 10).



**Figura 10.** Porcentajes de color verde, color marrón y planta formada en ápices de yemas terminales del cultivar Masaya a los 60 días de establecidos en nueve variantes de medios de cultivo.

En las variables longitud de planta y número de hojas a los 60 días, no se registraron diferencias estadísticas entre los tratamientos 5 y 6, pero sí entre éstos y los demás tratamientos, de acuerdo a la prueba de rangos múltiples. En estos mismos medios (1 mg/l de AIA y 1 mg/l de BAP) también se presentó la mayor longitud de brotes de categoría entre 4-6 mm y mayores de 6 mm; no se observó emisión de brotes en los medios que no contenían BAP. Tabla 11.

**Tabla 11.** Longitud de plantas, número de hojas y longitud de brotes a los 60 días de establecidos, ápices de yemas axilares del cultivar Masaya.

Nº de trat.	AIA - BAP (mg/l)		Longitud de planta (cm.)	Número de hojas	Longitud de brotes (escala en mm)				?²
	0	1-3			4-6	> 6			
1	0	0	0.610 c	1.300 c	100	0	0	0	c
2	0.5	0	1.300 b	2.000 bc	100	0	0	0	c
3	1	0	0.000 d	0.000 d	100	0	0	0	c
4	0	1	0.365 cd	1.700 c	45	40	15	0	a
5	0.5	1	1.840 a	2.900 b	50	10	20	20	b
6	1	1	2.025 a	4.050a	35	30	20	15	a
7	0	2	1.235 b	2.200 bc	45	30	15	10	a
8	0.5	2	1.175 b	2.700 b	15	40	40	5	a
9	1	2	0.640 c	2.100 bc	30	55	10	5	a

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller como para ?² con  $\alpha = 0.05$ .

De acuerdo a los resultados, la respuesta de los ápices extraídos de yemas axilares fueron superiores a la de los ápices extraídos de yemas terminales, debido posiblemente a que en los primeros se favorece el rejuvenecimiento fisiológico que caracteriza a tejidos juveniles, de manera que los ápices axilares están en capacidad de formar plantas a los 30 días después de establecidos, principalmente en los medios a los que se les adicionó 0.50 y 1 mg/l de AIA más 1mg/l de BAP.

De los resultados obtenidos con ápices extraídos de yemas terminales como de yemas axilares, se comprobó que la adición de auxina y de citoquinina es fundamental para que ocurran eventos dentro de las células de los explantes para que logre la diferenciación que paulatinamente conduzca a la formación de plantas completas.

Monge *et al*; (1987), a los 120 días obtuvieron mejores resultados en el establecimiento de ápices de quequisque morado, en un medio de cultivo MS suplementado con 10 mg/l de AIA; en quequisque blanco 25 mg/l de AIA y 2 mg/l de BAP.

Barceló *et al*; (1995), afirman que en los ápices, la citoquinina endógena es muy baja porque se sintetiza en las raíces, de manera que la adición exógena de la misma en los medios de cultivo durante el establecimiento es esencial para el proceso de división celular, facilitando la citocinesis.

Usualmente en los meristemas y ápices la citoquinina endógena es baja debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que la adición exógena de citoquininas en los medios de establecimiento es generalizada (Vázquez y Torres, 1995).

La contaminación se detectó en porcentajes de 35% de los ápices, observándose como un pequeña nube blanca en la base de los tejidos, que están en contacto directo con el medio de cultivo. De acuerdo a pruebas morfológicas y bioquímicas se identificó la bacteria (*Sarcina flava*). Esta bacteria no se reporta como patógena del cultivo de quequisque, además de no causar afectación severa en los explantes permite que continúe creciendo.

#### 4.1.2 Fase de multiplicación

En la organogénesis *in vitro* el efecto de las citoquininas está encaminada a la formación de yemas, que se incrementa en base a una proporción alta citoquinina con respecto a las auxinas. Durante la diferenciación las yemas axilares no se inhiben recíprocamente en su desarrollo, debido a que se anula la dominancia apical, hecho que puede extrapolarse a las plantas intactas pues las citoquininas aplicadas exógenamente en general activan el crecimiento de las yemas laterales.

##### 4.1.2.1 Explantes de yemas terminales

###### 4.1.2.1.1 Primer subcultivo

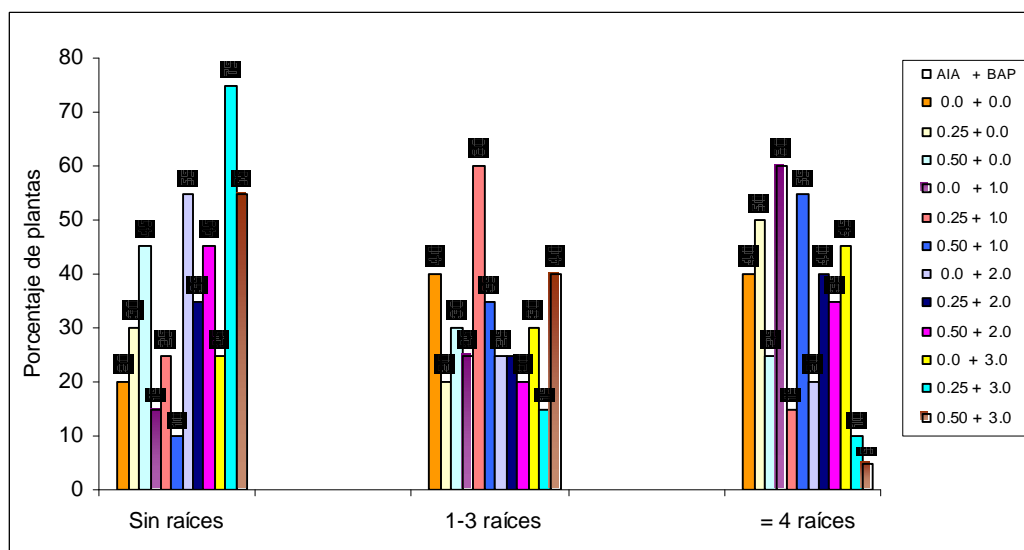
La longitud de planta fue mayor en los medios a los que no se le adicionó BAP, alcanzando los mejores comportamientos estadísticos en los tratamientos 1 y 2 con promedios respectivos de 2.02 y 2.77; estos valores muestran diferencia significativa en relación a los obtenidos en los tratamientos 5, 11 y 12. El número de hojas fue similar estadísticamente en los tratamientos 6 y 8 siendo estos a su vez los que obtuvieron mayor promedio de hojas. En las variables, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes no se presentaron diferencias estadísticas entre sí en los diferentes tratamientos. Ver tabla 12.

**Tabla 12.** Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el primer subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas terminales del cultivar Masaya.

Nº de trat.	AIA - BAP (mg/l)	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas por brotes	
1	0	0	2.02 a	2.80 bc	0.40 a	0.31 a	1.05 a
2	0.25	0	2.77 a	3.30 ab	0.45 a	0.15 a	0.70 a
3	0.50	0	1.53 abc	2.80 bc	0.50 a	0.12 a	0.70 a
4	0	1	1.58 abc	3.15 abc	0.65 a	0.20 a	0.50 a
5	0.25	1	1.23 bc	3.10 abc	0.70 a	0.29 a	0.65 a
6	0.50	1	1.76 abc	3.45 a	0.55 a	0.31 a	0.65 a
7	0	2	1.18 ac	3.15 abc	0.50 a	0.25 a	0.50 a
8	0.25	2	1.42 abc	3.50 a	0.35 a	0.32 a	0.50 a
9	0.50	2	1.35 abc	2.90 bc	0.15 a	0.12 a	0.35 a
10	0	3	1.70 abc	3.15 abc	0.45 a	0.30 a	0.50 a
11	0.25	3	1.13 c	3.15 abc	0.30 a	0.20 a	0.55 a
12	0.50	3	1.12 c	2.65 c	0.15 a	0.12 a	0.20 a

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller como para  $\chi^2$  con  $\alpha = 0.05$ .

La producción de raíces se produjo en todos los tratamientos, sin embargo, en los medios con 0.25 mg/l de AIA; 1 mg/l de BAP y 0.50 mg/l de AIA con 1 mg/l de AIA, las plantas emitieron mayor cantidad de raíces con porcentajes respectivos de 50, 60 y 55%. En medios que contenían 2 mg/l de BAP; 0.25 mg/l de AIA con 3 mg/l de BAP y 0.50 mg/l de AIA con 3 mg/l de BAP, el porcentaje de plantas que no formaron raíces fue del 55, 75 y 60% respectivamente. Con esta respuesta se evidencia que en el primer subcultivo el nivel endógeno de AIA es todavía alto, porque se estimula la producción de raíces y se reduce la brotación axilar por efectos de dominancia apical (Figuras 11 y 12).



**Figura 11.** Escala de emisión de raíces en plantas regeneradas de yemas terminales en el primer subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya. Izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de raíces de 1-3 raíces derecha plantas con emisión de 4 a más raíces.



**Figura 12.** Diferente respuesta de plántulas del cultivar Masaya en fase de multiplicación.

#### 4.1.2.1.2 Segundo subcultivo

Similar al comportamiento en el primer subcultivo, la longitud de la planta fue superior en los medios a los que no se les agregó BAP, ente estos en el tratamiento que contenía 0.25 mg/l de AIA sin adición de BAP. El número de hojas en los diferentes medios de cultivo no registraron diferencia estadísticas entre sí, observándose un rango de emisión promedio de 2.75 a 3.15 hojas. Las plantas desarrolladas en los en los tratamientos 9 y 11 presentaron la mayor tasa de brotación siendo estadísticamente iguales entre sí. El número de brotes axilares fue reducido en los medios que no contenían BAP. La longitud de brotes y número de hojas por brotes fue favorecida por el medio suplementado por 3 mg/l de BAP sin adición de AIA.

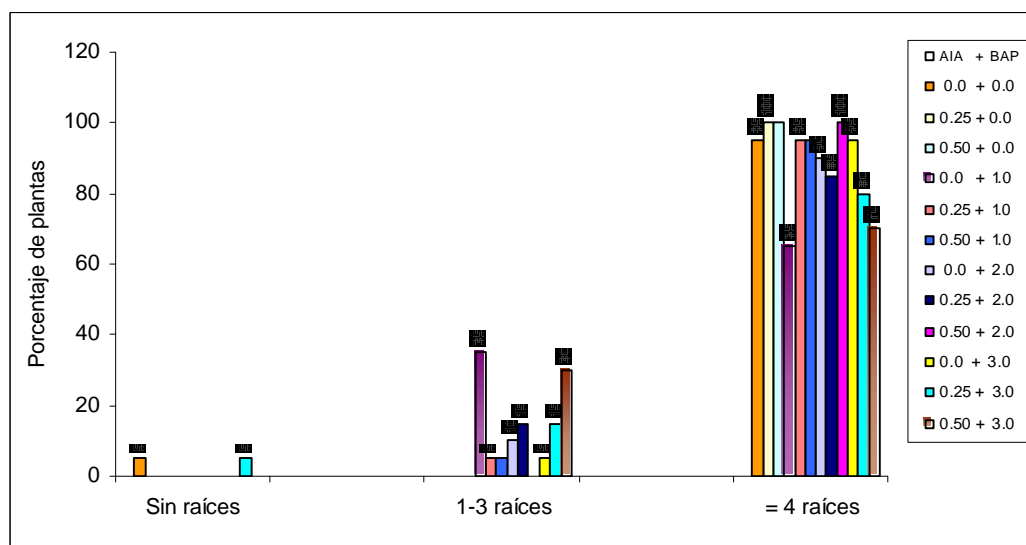
El comportamiento observado en el segundo subcultivo, fue similar al observado en el primer subcultivo, comprobándose que una mayor longitud de plantas no significa que habrá mayor emisión de hojas, más bien la respuesta de estas dos variables está influenciada por el nivel endógeno y exógeno de auxinas y citoquininas, parece que el suministro de BAP reduce la longitud de la planta pero favorece la producción de follaje Ver tabla 13.

**Tabla 13.** Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el segundo subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas terminales del cultivar Masaya.

Nº de trat.	AIA - BAP (mg/l)		Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas por brotes
1	0	0	2.45 abc	2.75 a	0.30 de	0.32 cd	0.65 cd
2	0.25	0	2.77 a	3.00 a	0.15 e	0.16 cd	0.36 d
3	0.50	0	2.70 ab	3.15 a	0.10 e	0.12 d	0.30 d
4	0	1	1.67 d	2.85 a	0.80 bcde	0.40 bcd	0.80 cd
5	0.25	1	1.82 cd	2.75 a	1.15 ab	0.85 a	1.85 ab
6	0.50	1	1.95 cd	3.10 a	0.50 cde	0.23 cd	0.65 cd
7	0	2	1.87 cd	3.00 a	0.55 cde	0.22 cd	0.75 dc
8	0.25	2	2.07 bcd	3.05 a	1.20 abcd	0.48 bc	1.15 bc
9	0.50	2	1.92 cd	2.95 a	1.85 a	0.82 a	1.85 ab
10	0	3	1.10 abcd	3.10 a	1.65 ab	0.96 a	2.10 a
11	0.25	3	2.07 bcd	3.10 a	1.75 a	0.67 ab	1.70 ab
12	0.50	3	1.85 cd	3.05 a	1.30 abc	0.42 bcd	1.20 bc

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller como para  $\chi^2$  con  $\alpha = 0.05$ .

Los medios sin reguladores de crecimiento y con 0.25 mg/l de AIA y 3 mg/l de BAP fue en los que únicamente el 5% de las plantas no formación de raíces. En las demás variantes la formación de raíces en escala de 1 a 3 raíces estuvo en un rango el 5% al 35% de las plantas y en la escala de 4 ó más raíces entre el 65% y el 100% de las plantas (Figura 13).



**Figura 13.** Escala de emisión de raíces en plantas regeneradas de yemas terminales en el segundo subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya. Izquierda: plantas sin raíces, centro plantas con emisión de raíces de 1-3 raíces derecha plantas con emisión de 4 a más raíces.

#### 4.1.2.1.3 Tercer subcultivo

En el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento la longitud de planta superó estadísticamente a los promedios alcanzados en los demás tratamientos; pero el número de hojas fue superior en el medio que se le adicionaron únicamente 3 mg/l de BAP. El número de brotes axilares fue mínimo en los medios que no contenían BAP y en el medio que contenía 0.5 mg/l de AIA y 3 mg/l de BAP se obtuvo el mayor promedio de brotes axilares. Cuando se agregó 3 mg/l de BAP con o sin adición de AIA, las variables longitud de brotes, número de hojas por brote y el número de brotes por planta alcanzaron los mejores promedios Ver tabla 14.

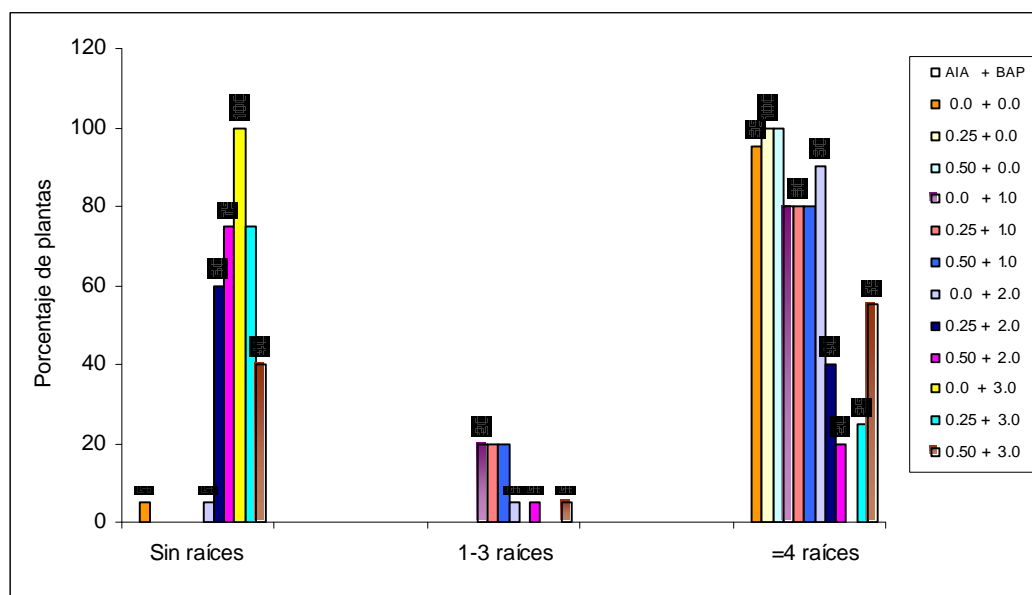
Es notable destacar que a medida que aumenta el número de subcultivos hay una tendencia proporcional en el número de brotes por explantes.

**Tabla 14.** Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el tercer subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas terminales del cultivar Masaya.

Nº de trat.	AIA - BAP (mg/l)		Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas por brotes
1	0	0	3.57 a	3.40 cd	0.20 de	0.15 cd	0.35 cd
2	0.25	0	2.85 b	3.35 cd	0.55 cde	0.15 cd	0.40 cd
3	0.50	0	3.00 ab	3.05 d	0.10 e	0.05 d	0.15 d
4	0	1	1.82 def	3.40 cd	0.85 bcde	0.50 abc	1.05 abc
5	0.25	1	2.02 de	3.30 cd	1.35 abc	0.70 a	1.5 5a
6	0.50	1	2.17 cd	3.30 cd	0.25 de	0.25 bcd	0.50 bcd
7	0	2	2.70 bc	3.55 bcd	0.95 abcde	0.50 abc	1.20 abc
8	0.25	2	1.98 de	3.75 bc	1.15 abcd	0.47 abcd	1.10 abc
9	0.50	2	1.57 def	4.15 ab	1.15 abcd	0.42 abcd	1.35 ab
10	0	3	1.22 f	4.50 a	1.70 ab	0.42 abcd	1.60 a
11	0.25	3	1.44 ef	4.15 ab	1.55 ab	0.66 ab	1.90 a
12	0.50	3	2.15 cd	3.70 bc	1.90 a	0.70 a	1.75 a

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller como para  $\chi^2$  con  $\alpha = 0.05$ .

Únicamente en el medio de cultivo con 3 mg/l de BAP y sin AIA, no se indujo a la formación de raíces en el 100% de las plantas. La formación de raíces se estimuló en los medios sin adición de BAP o con solamente 1 mg/l de BAP, como se aprecia en la figura 14.



**Figura 14.** Escala de emisión de raíces en planta regeneradas de yemas terminales en el tercer subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya. Izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de raíces de 1-3 raíces derecha plantas con emisión de 4 a más raíces.



#### **4.1.2.2 Explantes de yemas axilares**

##### **4.1.2.2.1 Primer subcultivo**

En longitud de planta los mejores promedios se presentaron en los medios que se les adicionaron 0.25 y 0.50 mg/l de AIA sin BAP, en el tratamiento 3 fue mayor promedio con longitud de 2.95 cm. El promedio de número de hojas en los diferentes medios de cultivo osciló en un rango entre 2.30 y 3.10, destacándose el promedio obtenido en el medio suplementado con 0.25 mg/l de AIA sin BAP. El promedio de brotes obtenido en el medio suplementado con 3 mg/l de BAP sin AIA superó estadísticamente únicamente a los promedios registrados en los medios sin reguladores de crecimiento; con solo 0.5 mg/l de AIA y al que se agregaron 0.25 mg/l de AIA y 3 mg/l de BAP. No se presentó brotación en el medio sin reguladores de crecimiento.

En longitud de brotes se alcanzó el mayor promedio en el medio que contenía 3 mg/l de BAP sin AIA diferenciándose estadísticas de los demás tratamientos. Los promedios de número de hojas por brotes registrados no mostraron diferencias estadísticamente entre sí. Ver tabla 15.

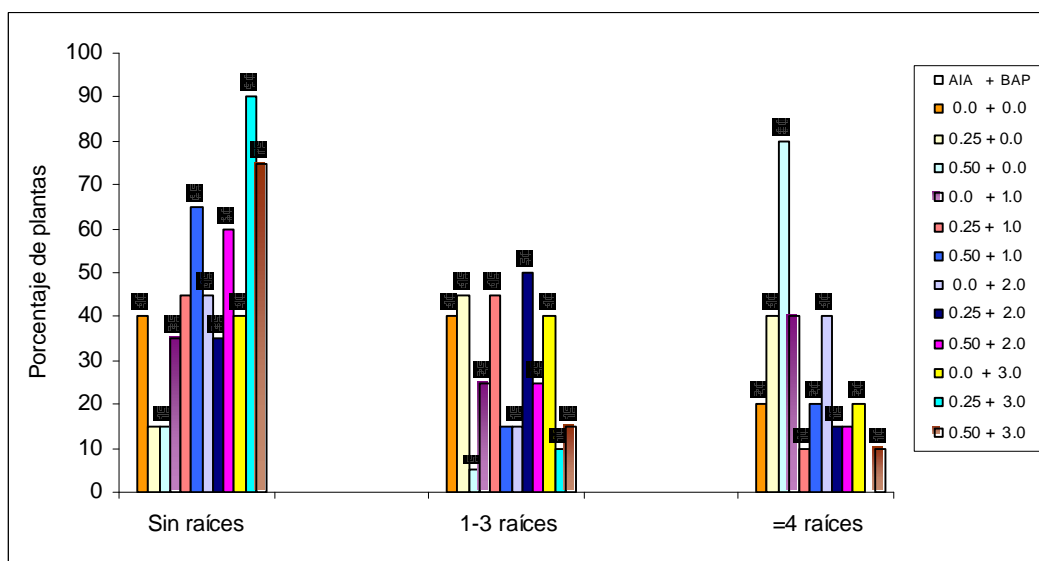
En comparación a los promedios obtenidos en el primer subcultivo con los explantes provenientes de yemas terminales, con yemas axilares los resultados fueron inferiores y sin una tendencia clara a estimular la brotación axilar de acuerdo al balance auxina-citoquinina. Sin embargo, la inhibición de la brotación axilar ocurrió en ausencia de auxina y citoquinina. La reducida brotación axilar observada en el primer subcultivo parece estar influenciada por el efecto endógeno que todavía ocasiona el AIA.

**Tabla 15.** Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el primer subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas axilares del cultivar Masaya.

Nº de trat.	AIA - BAP (mg/l)		Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas por brotes
1	0	0	1.59 cd	2.95 ab	0.0 c	0.00 d	0.00 a
2	0.25	0	2.51 ab	3.10 a	0.55 ab	0.40 ab	0.60 a
3	0.50	0	2.95 a	2.80 ab	0.05 c	0.07 cd	0.10 a
4	0	1	2.17 bc	2.75 ab	0.60 ab	0.35 abc	0.30 a
5	0.25	1	1.46 d	2.70 ab	0.30 abc	0.17 bcd	0.20 a
6	0.50	1	1.81 cd	2.65 ab	0.45 abc	0.34 abc	0.95 a
7	0	2	1.80 cd	2.85 ab	0.35 abc	0.39 ab	1.05 a
8	0.25	2	1.71 cd	2.90 ab	0.20 abc	0.17 bcd	0.30 a
9	0.50	2	1.38 d	2.30 b	0.15 bc	0.12 bcd	0.25 a
10	0	3	1.75 cd	2.75 ab	0.65 a	0.60 a	0.65 a
11	0.25	3	1.15 d	2.45 ab	0.05 c	0.02 d	0.05 a
12	0.50	3	1.28 d	2.45 ab	0.25 abc	0.10 bcd	0.10 a

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller como para  $\chi^2$  con  $\alpha = 0.05$ .

La prueba de  $\chi^2$  reflejó que la mayor diferencia entre plantas con buen número de raíces y las que no emitieron raíces, se presentó en los medios que contenían 0.50 mg/l de AIA sin adición de BAP con el 80% de plantas con cuatro o más raíces y en el medio con 0.25 mg/l de AIA y 3 mg/l de BAP con el 90% de plantas que no presentaron raíces (Figura 15).



**Figura 15.** Escala de emisión de raíces en planta regeneradas de yemas axilares en el primer subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya. Izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de raíces de 1-3 raíces derecha plantas con emisión de 4 a más raíces.

#### 4.1.2.2.2 Segundo subcultivo

La longitud de planta en los medios sin citoquinina fue estadísticamente superior a los promedios alcanzados principalmente en los medios que contenían concentraciones entre 2 y 3 mg/l de BAP con o sin adición de AIA. Esta respuesta de los explantes en longitud de planta fue superior comparada con la observada con explantes de yemas terminales.

En el número de hojas no se presentaron diferencias estadísticas en los diferentes tratamientos, pero sí en el promedio de brotes destacando el efecto del medio suplementado con 3 mg/l de BAP y mientras que el menor promedio se obtuvo en el medio que no se le adicionó reguladores de crecimiento. La altura de brotes y número de hojas por brotes fueron favorecidas con los mayores promedios, en el medio suplementado con 1 mg/l de BAP sin AIA. Ver tabla 16.

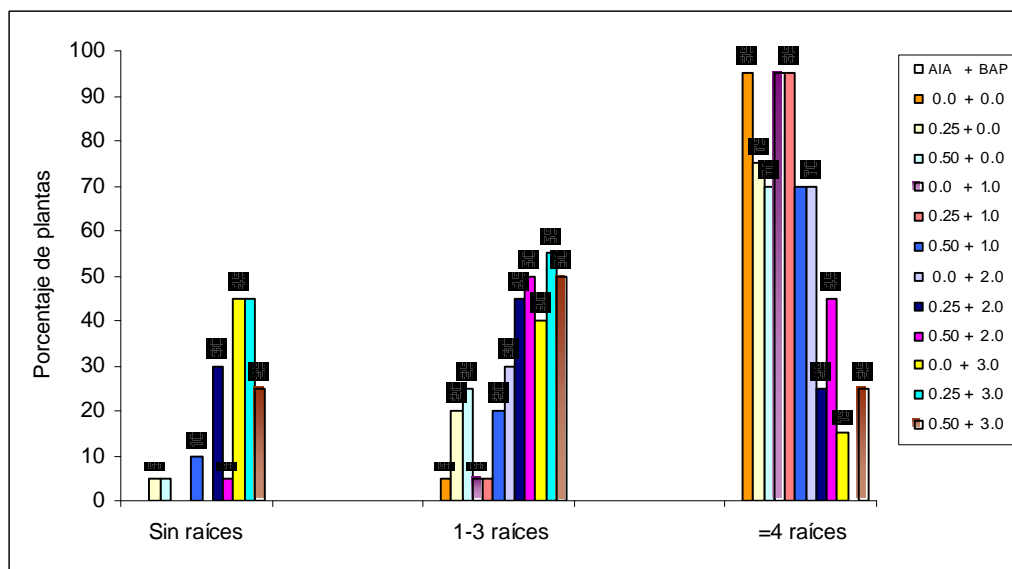
Estos resultados fueron inferiores comparados con los promedios de brotación producido en el segundo subcultivo con explantes de yemas terminales, debido posiblemente a que con explantes de yemas axilares se manifiesta el fenómeno de rejuvenecimiento de los tejidos al estimular la formación de plantas de mayor longitud, que a la vez ejercen un efecto de dominancia apical afectando la brotación de yemas axilares.

**Tabla 16.** Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el segundo subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas axilares del cultivar Masaya.

Nº de trat.	AIA-BAP (mg/l)	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas por brotes
1	0 0	4.50 a	3.70 a	0.10 b	0.07 b	0.15 b
2	0.25 0	3.86 ab	3.40 ab	0.70 ab	0.39 ab	0.75 ab
3	0.50 0	4.07 ab	3.50 ab	0.20 b	0.17 ab	0.30 b
4	0 1	3.60 bc	3.45 ab	0.95 ab	0.60 a	1.25 a
5	0.25 1	3.77 abc	3.25 ab	0.50 ab	0.45 ab	0.75 ab
6	0.50 1	3.27 bcd	3.10 a	0.85 ab	0.42 ab	0.85 ab
7	0 2	2.37 ef	3.25 ab	0.40 b	0.17 ab	0.45 ab
8	0.25 2	2.70 def	3.25 ab	0.40 b	0.20 ab	0.55 ab
9	0.50 2	2.95 cde	3.70 a	0.45 ab	0.25 ab	0.50 ab
10	0 3	2.15 ef	3.40 ab	1.30 a	0.47 ab	1.05 ab
11	0.25 3	1.95 f	3.30 ab	0.60 ab	0.39 ab	0.85 ab
12	0.50 3	2.37 ef	3.50 ab	0.85 ab	0.37 ab	0.85 ab

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller como para  $\chi^2$  con  $\alpha = 0.05$ .

El menor número de raíces se presentó en los medios suplementados con 3 mg/l de BAP con o sin AIA; mientras que sin BAP, con 1 y 2 mg/l de BAP con o sin AIA se mostró un incremento en el porcentaje de raíces (Figura 16).



**Figura 16.** Escala de emisión de raíces en planta regeneradas de yemas axilares en el segundo subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya. Izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de raíces de 1-3 raíces derecha plantas con emisión de 4 a más raíces.

#### 4.1.2.2.3 Tercer subcultivo

En los medios que no contenían BAP, al igual que en los subcultivos anteriores, los promedios de longitud de planta superaron estadísticamente a los que sí contenían BAP, destacando la respuesta de las plantas al medio sin reguladores de crecimiento.

El número de hojas promedio producido por planta en los diferentes tratamientos osciló entre 3.05 a 4.15, resultando el tratamiento con 0.50 mg/l de AIA más 3 mg/l de BAP el que mostró el promedio más alto, aunque este promedio fue estadísticamente similar al presentado en las variantes que también se les agregaron 3 mg/l de BAP en combinación con 0 y 0.25 mg/l de AIA.

En la variante de medio que contenía 0.25 mg/l de AIA y 2 mg/l de BAP se alcanzaron los promedios más altos de brotes axilares por explante. En las variantes de medios que

no se le adicionó BAP no se logró brotación. No se alcanzaron los coeficientes de brotación del tercer subcultivo con explantes de yemas terminales, pero el orden de respuesta a la variante de medio de cultivo fue muy similar.

Analizando el comportamiento de la brotación en los tres subcultivos, se deduce que cuando adicionamos citoquinina al medio de cultivo se producen los mejores promedios de brotación axilar, destacando que con la adición de 3 mg/l de BAP se induce a una brotación más estable en relación a los demás medios de cultivo.

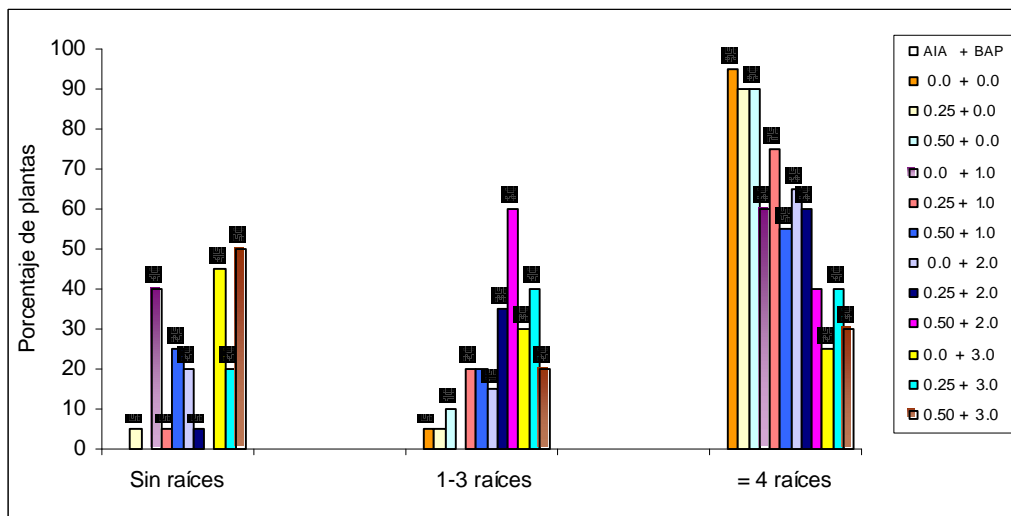
En las variables longitud de brotes y número de hojas por brote, los mejores promedios fueron obtenidos en los medios que contenían solamente 3 mg/l de BAP. Ver Tabla 17.

**Tabla 17.** Longitud de plantas, número de hojas, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brotes en el tercer subcultivo de multiplicación de plantas obtenidas de yemas axilares del cultivar Masaya

Nº de trat.	AIA	BAP	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Longitud de brotes (cm)	Número de hojas de brotes
	(mg/l)	(mg/l)					
1	0	0	4.17 a	3.15 de	0.00 c	0.00 c	0.00 c
2	0.25	0	3.90 ab	3.45 cd	0.00 c	0.00 c	0.00 c
3	0.50	0	3.42 bc	3.05 e	0.00 c	0.00 c	0.00 c
4	0	1	2.24 def	3.65 bc	0.75 abc	0.38 bc	1.10 ab
5	0.25	1	2.05 ef	3.10 de	0.25 bc	0.05 cd	0.15 c
6	0.50	1	1.75 f	2.90 e	0.90 ab	0.32 bcd	1.00 b
7	0	2	2.76 cde	3.65 bc	0.75 abc	0.28 bcd	0.95 b
8	0.25	2	3.12 c	3.70 bc	1.35 a	0.45 ab	1.30 ab
9	0.50	2	2.82 cd	3.75 bc	0.55 abc	0.32 bcd	0.75 bc
10	0	3	2.75 cde	3.95 ab	1.00 ab	0.77 a	1.80 a
11	0.25	3	3.20 bc	4.00 ab	1.00 ab	0.51 ab	1.15 ab
12	0.50	3	2.95 cd	4.15 a	0.85 ab	0.61 ab	1.35 ab

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller como para  $\chi^2$  con  $\alpha = 0.05$ .

El porcentajes de plantas que emitieron mayor cantidad de raíces fueron observados en los medios que no se le adicionó BAP. Con una escala de 4 a más raíces un 90% al 95% de las plantas, el 20% al 60% de las plantas emitieron de 1-3 raíces. El mayor porcentaje de plantas que no emitieron raíces (entre un 20% al 50% de las plantas) se presentaron en los medios a los que se le adicionó 3 mg/l de BAP con o sin AIA (Figura 17).



**Figura 17.** Escala de emisión de raíces de planta regeneradas de yemas axilares en el tercer subcultivo de multiplicación del cultivar Masaya. Izquierda plantas sin raíces, centro plantas con emisión de raíces de 1-3 raíces derecha plantas con emisión de 4 a más raíces.

Los medios utilizados en la fase de multiplicación contienen citoquininas, los cuales estimulan el desarrollo precoz de las yemas axilares al inhibir la dominancia apical (Hu y Wang, 1984), posibilitando con esto, en un corto periodo la realización de un nuevo subcultivo.

Gómez *et al*; (1989), evaluaron el efecto de la combinación de 0.05 mg/l de AIA con 1 mg/l de BAP sobre la producción de brotes en el corno principal, con y sin yema terminal. En el corno sin yema apical, se obtuvo un número de brotes similar al obtenido en la zona apical. Cuando la yema apical estuvo presente, se observó un rápido crecimiento del brote principal y una disminución en el número y desarrollo de los nuevos brotes.

George (1993), señala que las citoquininas generalmente inhiben el crecimiento de las raíces, aunque pueden estimular la iniciación del crecimiento de raíces laterales en muy bajas concentraciones; además inhiben la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas; actúan en el retraso de la senescencia y tienen un papel fundamental en la organogénesis, ya que pueden ser inducidas yemas en tejidos *in vitro* de callo, hojas, raíces, cotiledones o piezas de tallo.

Gómez *et al*; (1989), reportan una pobre respuesta a la brotación axilar cuando el único fitoregulador en el medio de cultivo fue el BAP y que la adición de AIA aparentemente modificó el rango de acción del BAP y favoreció la brotación en la mayoría de las combinaciones evaluadas sobre todo en quequisque color lila (*Xanthosoma violaceum*) en este experimento utilizó AIA (0.0, 0.01 y 0.05 mg/l) y BAP (0, 1, 2 y 4 mg/l).

Monge *et al*; (1987), reportan en quequisque lila un promedio de 5 brotes axilares obtenidos en un medio MS suplementado con 0.05 mg/l de AIA y 1 mg/l de BAP. Estos mismos autores encontraron que la acción de AIA aparentemente modificó el rango de acción del BAP y favoreció la brotación en la mayoría de las combinaciones que evaluaron.

Dottin (2000), encontró incrementos en los coeficientes de multiplicación después del tercer subcultivo manteniéndose un promedio de 3.02 brotes por explante.

#### **4.1.3 Fase de enraizamiento**

##### **4.1.3.1 Explantes de yemas terminales**

En el análisis de rangos múltiples de Duncan-Waller en la interacción medio de cultivo-consistencia del medio no se registraron diferencias estadísticas significativas en las variables longitud de plantas y número de hojas pero sí en el número de raíces. El número de raíces fue superior en los medios constituidos por las sales MS reducidas al 50% y de consistencia líquida y las sales al 100% de su concentración y de con consistencia sólida, superando estadísticamente a los promedios alcanzados en las demás variantes. Ver tabla 28.

**Tabla 18.** Longitud de planta, número de hojas y número de raíces en plantas reproducidas de yemas terminales del cultivar Masaya, en la fase de enraizamiento.

Variables	Consistencia	Medios de cultivo		
		MS (100% sales)	MS (50% sales)	MS (100% sales) + 1mg/l de AIA
Longitud de planta	Líquida	1.34 a	1.84 a	1.68 a
	Sólida	1.56 a	1.72 a	1.94 a
Número de hojas	Líquida	3.36 a	2.92a	3.16 a
	Sólida	3.04 a	3.16 a	3.24 a
Número de raíces	Líquida	2.12 c	7.80 a	2.68 c
	Sólida	7.32 ab	5.20 b	5.24 b

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y con ( $\alpha = 0.05$ ).

#### 4.1.3.2 Explantes de yemas axilares

No se registraron diferencias estadísticas significativas en longitud de planta, pero los mayores promedios se alcanzaron en las plantas que se desarrollaron en los medios en consistencia líquida con las sales MS al 100% más 1 mg/l de AIA. El promedio de número de hojas emitidas en el medio con las sales MS al 50% y de consistencia líquida fue superior estadísticamente a los promedios de hojas producidos en los medios con las sales al 100% de consistencia líquida y sólida. El promedio de raíces en los medios con la concentración de sales MS al 50% y de consistencia líquida y 100% de las sales con 1 mg/l de AIA de consistencia sólida, presentaron los mejores promedios, superando estadísticamente a los promedios de raíces producidos en el medio con las sales al 100% de consistencia líquida. Ver tabla 29.

**Tabla 19.** Longitud de planta, número de hojas y número de raíces en plantas reproducidas de yemas axilares del cultivar Masaya en la fase de enraizamiento.

Variables	Consistencia	Medios de cultivo		
		MS (100% sales)	MS (50 % sales)	MS (100% sales) + 1mg/l de AIA
Longitud de planta (cm)	Líquida	1.02 a	1.14 a	1.42 a
	Sólida	1.06 a	1.18 a	1.34 a
Número de hojas	Líquida	2.24 b	2.92 a	2.68 ab
	Sólida	2.24 b	2.64 ab	2.52 ab
Número de raíces	Líquida	4.48 b	8.24 a	5.64 ab
	Sólida	5.76 ab	5.56 ab	8.08 a

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y con ( $\alpha = 0.05$ ).



Los promedios de las variables longitud y número de hojas presentaron tendencia a ser favorecida con plántulas reproducidas de yemas terminales y el número de raíces se favoreció con fuente de tejidos de yemas axilares.

García *et al*; (1999), reportan las sales MS reducidas al 50% en estado líquido y con 30 g de sacarosa como mejor medio de cultivo para el enraizamiento de quequisque.

En la mayoría de los casos la presencia de citoquininas en la fase de multiplicación inhiben la formación de las raíces, por eso se debe usar un medio inductor de raíces en la fase de enraizamiento. Rodríguez (1998), recomienda para la fase de enraizamiento de quequisque la adición de bajas concentraciones de AIA al medio de cultivo. Las auxinas más frecuentemente incorporadas al medio para inducir enraizamiento son AIA (0.1-10 mg/l) ANA (0.05-1 mg/l) y el IBA (0.5-3 mg/l), (George y Sherrington, 1984).

En la fase de enraizamiento el medio líquido ofrece la posibilidad de aumentar la capacidad de incubación en las cámaras de crecimiento y disminuir el consumo de agar durante la fase de enraizamiento. De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, el quequisque se puede considerar una de las especies de fácil inducción de raíces, basta con solo transferir brotes o grupos de brotes incluso en un medio sin reguladores de crecimiento.

#### **4.1.4 Fase de aclimatización**

El objetivo principal de la fase de aclimatización es lograr la sobrevivencia de las plantas al momento del trasplante y crecimiento de las mismas, a partir de minerales, agua CO<sub>2</sub> y luz. Este cambio de las plantas, así como la morfología de la misma determina la susceptibilidad durante las etapas inicial del proceso de aclimatización. (Agramonte, 1998).

La fase de aclimatización a condiciones ambientales es una de las fases que reviste gran importancia dentro de la técnica de micropropagación. Las plantas *in vitro* en un inicio

deben de adaptarse en condiciones que se acerquen al ambiente *in vitro*, alta humedad relativa y baja intensidad lumínica. Posteriormente debe reducirse de manera gradual la humedad relativa y aumentar la intensidad luminosa para que las plantas se desarrolle en un ambiente parecido a las condiciones de campo (Orellana, 1998).

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

#### 4.1.4.1 Explantes de yemas terminales

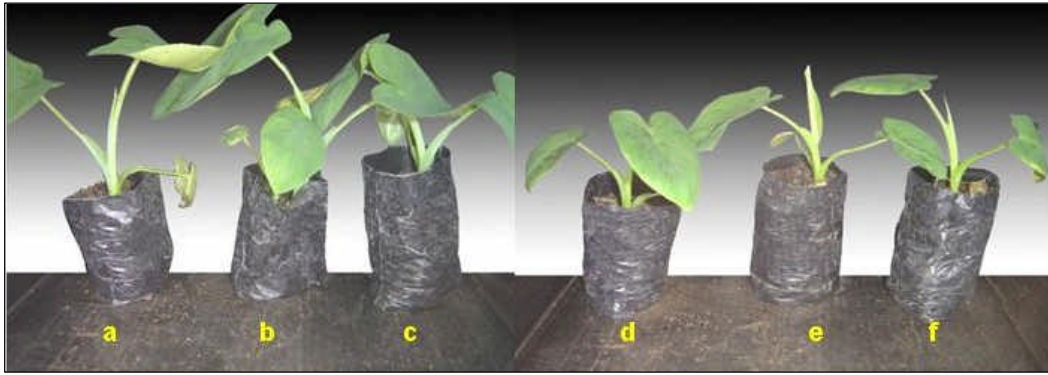
De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de rangos múltiples de Duncan en las variables longitud de planta, número de hojas y diámetro de pseudotallo, no se presentaron diferencias significativas por efecto de las variantes de medios de cultivos.

Estos resultados demuestran que plantas reproducidas a partir de yemas terminales y enraizadas en los medios de cultivo con las sales al 100% y 50%; y 100% de las sales más 1 mg/l de AIA tanto de consistencia sólida y líquida, no produjeron diferencias marcadas en el crecimiento de las plantas aclimatizadas a los treinta días. La variable que marcó la diferencia entre los medios de cultivo fue el % de sobrevivencia de las plantas, que fue del 100% únicamente en el medio sólido que contenía las sales MS al 100% (Tabla 20 y Figura 18).

**Tabla 20.** Longitud de planta, número de hojas, diámetro de pseudotallo y porcentaje de sobrevivencia a los 45 días en plantas reproducidas de yemas terminales del cultivar Masaya en la fase de aclimatización.

Variables	Consistencia	Medios de cultivo		
		MS (100% sales)	MS (50% sales)	MS (100% sales) + 1mg/l de AIA
<b>Longitud de planta</b>	Líquida	4.37 a	5.30 a	4.30 a
	Sólida	3.87 a	3.85 a	4.47 a
<b>Número de hojas</b>	Líquida	2.35 a	2.60 a	2.25 a
	Sólida	2.30 a	2.40 a	2.30 a
<b>Diámetro de pseudotallo</b>	Líquida	0.40 a	0.55 a	0.40 a
	Sólida	0.42 a	0.40 a	0.42 a
<b>Sobrevivencia</b>	Líquida	76%	86%	88%
	Sólida	100%	84%	84%

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan (a = 0.05).



**Figura 18.** Plantas de 45 días de aclimatizadas propagadas de yemas terminales. Izquierda, plantas previamente enraizadas en medio líquido a) Medio 100% sales MS b) Medio al 50% de las sales c) Medio 100% sales más 1 mg/l de AIA. Derecha: plantas previamente enraizadas en medio sólido d) Medio 100% sales MS e) Medio al 50% de las sales e) Medio 100% sales más 1 mg/l de AIA.

#### 4.1.4.2 Explantes de yemas axilares

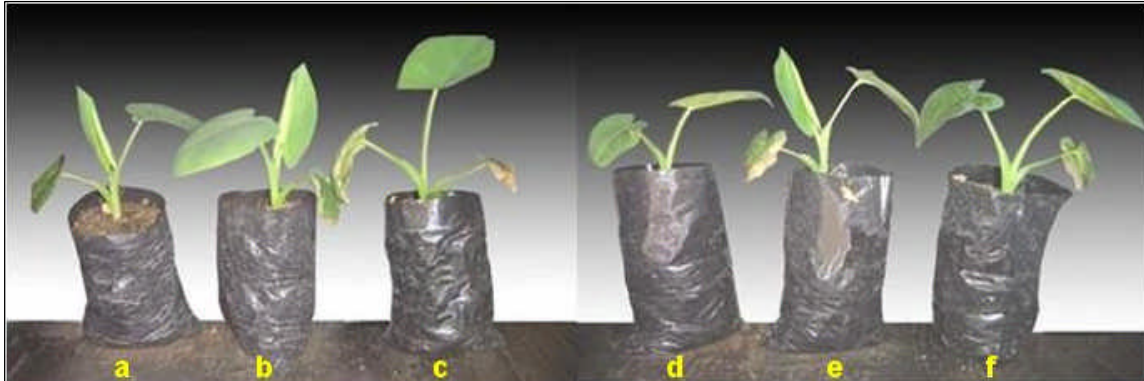
Las plantas previamente enraizadas en los medios de cultivos de consistencia líquida y sólida, no presentaron diferencias significativas en longitud y número de hojas a los 45 días de aclimatizadas. El promedio de diámetro del pseudotallo de las plantas en los medios que contenían el 100% y el 50% de las sales ambos de consistencia líquida, fueron inferiores estadísticamente al diámetro obtenido en las plantas previamente enraizadas en el medio con las sales al 50% y de consistencia sólida (0.42 cm). La sobrevivencia de las plantas fue mayor en el medio sólido que contenía las sales al 100 % con 96%, aunque en el medio con las sales reducidas al 50% y de consistencia tanto sólida como líquida, la sobrevivencia fue del 92 %. Ver tabla 21.

**Tabla 21.** Longitud de planta, número de hojas, diámetro de pseudotallo y porcentaje de sobrevivencia a los 45 días en plantas reproducidas de yemas axilares del cultivar Masaya en la fase de aclimatización.

Variables	Consistencia	Medios de cultivo		
		MS (100% sales)	MS (50% sales)	MS (100% sales) + 1mg/l de AIA
Longitud de planta	Líquida	2.75 a	3.52 a	3.35 a
	Sólida	3.00 a	3.60 a	3.05 a
Número de hojas	Líquida	2.20 a	2.15 a	2.15 a
	Sólida	1.95 a	2.10 a	2.05 a
Diámetro de pseudotallo	Líquida	0.30 b	0.32 b	0.35 ab
	Sólida	0.35 ab	0.42 a	0.37 ab
Sobrevivencia	Líquida	88%	92%	80%
	Sólida	96%	92%	88%

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan (a = 0.05).

En la figura 19, se aprecia plantas reproducidas a partir de yemas axilares en los diferentes tratamientos del cultivar Masaya, para la fase de aclimatización.



**Figura 19.** Plantas de 45 días de aclimatizadas del cultivar Masaya, propagadas de yemas axilares. Izquierda, plantas previamente enraizadas en medio líquido a) Medio 100% sales MS b) Medio al 50% de las sales c) Medio 100% sales más 1 mg/l de AIA. Derecha: plantas previamente enraizadas en medio sólido d) medio 100% sales MS e) Medio al 50% de las sales e) Medio 100% sales más 1 mg/l de AIA.

En la aclimatización de las plantas obtenidas de los dos tipos de tejidos del cultivar Masaya, no se reflejaron diferencias determinantes entre ellos por efecto de los medios de cultivo y el tipo de consistencia durante la fase de enraizamiento, aunque sí hubo diferencias en % de sobrevivencia, con la tendencia a una mayor sobrevivencia cuando las plantas aclimatizadas se han desarrollado en medios de consistencia sólida durante la fase de enraizamiento.

El cultivar Masaya demostró en el estudio que es una especie que endógenamente tiene un alto nivel de auxinas, si consideramos que en las fases de establecimiento y de multiplicación los explantes emitieron regularmente buen número de raíces, además de ser un cultivo con una facilidad para adaptarse a las condiciones *ex vitro*.

Estudios reportados por Caldera y López (2002), en el cultivar plátano enano, hacen énfasis más a los constituyentes de los medios de cultivo que se agregan durante la fase de enraizamiento que al sustrato de aclimatización.

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

#### 4.1.5 Número de explantes por contenedor

##### 4.1.5.1 Explantes de yemas terminales

La prueba de rangos múltiples de Duncan-Waller para el número de explantes por contenedor solo detectó diferencias estadísticas en las variables número de brotes por planta y número de raíces por planta, presentándose promedios inferiores con 5 explantes. El mejor promedio de número de brotes por planta y número de raíces por planta se produjo con 4 explantes. Ver tabla 22.

**Tabla 22.** Longitud de plantas, número de hojas, número de raíces, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brote, en plantas obtenidas de yemas terminales del cultivar Masaya por efecto de densidad de explantes por contenedor en la fase de multiplicación.

<b>Tratamiento (Número de explantes)</b>	<b>Longitud plantas (cm)</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Número de raíces</b>	<b>Número brotes</b>	<b>Longitud brotes (cm)</b>	<b>Número de hojas/ brote</b>
<b>4</b>	2.00 a	3.30 a	4.60 a	1.20 a	0.31 a	0.60 a
<b>5</b>	1.32 a	3.96 a	1.16 b	0.68 b	0.15 a	0.68 a
<b>6</b>	1.73 a	4.10 a	5.66 a	0.73 b	0.30 a	0.73 a

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con ( $\alpha = 0.05$ ).

##### 4.1.5.2 Explantes de yemas axilares

Según la prueba de rangos múltiples de Duncan-Waller no se registraron diferencias estadísticas en las diferentes variables evaluadas. En la tabla 23 se puede observar que los mejores resultados fueron obtenidos con 4 explantes.

Comparando los promedios obtenidos entre los dos tipos de explantes, es evidente que las plántulas provenientes de yemas axilares favorecen la producción de raíces y el número de hojas. Igual que en los explantes de yemas terminales, el mejor promedio de brotación se produjo con 4 explantes.

**Tabla 23.** Longitud de plantas, número de hojas, número de raíces, número de brotes, longitud de brotes y número de hojas por brote en plantas obtenidas de yemas axilares del cultivar Masaya por efecto de densidad de explantes por contenedor en la fase de multiplicación.

Tratamiento (Número de explantes)	Longitud plantas (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Número brotes	Longitud brotes (cm)	Número de hojas /brote
4	1.80 a	3.55 a	6.95 a	1.10 a	0.41 a	1.95 a
5	2.40 a	3.48 a	7.68 a	0.96 a	0.41 a	1.56 a
6	1.75 a	3.20 a	6.26 a	0.66 a	0.28 a	1.23 a

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con (a = 0.05).

Diferentes autores reportados por Caldera y López (2002), destacan que cuando se inoculan una mayor densidad de explantes por contenedor se produce una mayor cantidad de brotes o de raíces, debido a que los explantes difunden sustancias como las auxinas y las citoquininas. Estos autores, obtuvieron en plátano, cultivar enano, mejor brotación axilar con la siembra de 5 y 6 plantas en contenedores de 100 y 200 ml. Evert y Holt (1975), citados por George (1993), observaron que normalmente el crecimiento *in vitro* en contenedores grandes es mejor cuando contienen muchos brotes, porque juntos ayudan a mantener una adecuada humedad relativa dentro del contenedor.

En el cultivar Masaya, el porcentaje de brotes obtenidos por yemas axilares fue mayor con respecto a los producidos por yemas terminales, esto se explica debido al efecto de dominancia apical.

#### **4.1.6 Inmersión Temporal**

##### **4.1.6.1 Explantes de yemas terminales**

Se detectaron diferencias estadística solamente en las variables longitud de plantas y número de raíces por planta, la primera favorecida con 3 inmersiones (3.31 cm) y la segunda con dos inmersiones (3.06 cm). En número de brotes aunque no se presentaron diferencias estadísticas, el mayor número de brotes fue favorecido con 3 inmersiones. Ver tabla 24.

**Tabla 24.** Longitud de planta, número de hojas, número de raíces y número de brotes en plantas reproducidas de yemas terminales del cultivar Masaya, utilizando el sistema RITA en la fase de multiplicación.

Tratamiento (Número de inmersiones por día)	Variables evaluadas			
	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Número brotes/planta
2	2.37 b	3.00 a	3.06 a	0.93 a
3	3.31 a	2.93 a	0.86 b	1.33 a

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con (a = 0.05).

#### 4.1.6.2 Explantes de yemas axilares

No se presentaron diferencias estadísticas en las diferentes variables evaluadas con 2 y 3 inmersiones por día. Contrario al comportamiento observado con el empleo de yemas terminales, con 2 inmersiones por día fue mayor el promedio de brotes axilares, pero sin reflejar diferencias estadísticas entre sí. Ver tabla 25.

**Tabla 25.** Longitud de planta, número de hojas, número de raíces y número de brotes en plantas reproducidas de yemas axilares del cultivar Masaya, utilizando el sistema RITA en la fase de multiplicación.

Tratamiento (Número de inmersiones por día)	Variables evaluadas			
	Longitud de planta (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Número brotes/planta
2	3.00 a	2.90 a	2.36 a	1.36 a
3	2.77 a	3.20 a	2.13 a	0.60 a

Letras distintas difieren estadísticamente entre sí, tanto para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con (a = 0.05).

En la figura 20, se observan plantas del cultivar Masaya que se desarrollaron con dos y tres frecuencias de inmersión.



**Figura 20.** Plantas del cultivar Masaya regeneradas por micropropagación en recipientes de inmersión temporal automatizada. Arriba: con frecuencia de dos inmersiones por día. Abajo: con frecuencia de tres inmersiones por día. Abajo izquierda: tamaño anormal de la hoja.

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

Se observó también que las plantas que se desarrollaron con frecuencia de riego de tres inmersiones, los tejidos presentaban síntomas de vitrificación, fenómeno conocido actualmente como hiperhidricidad, (hojas grandes, pseudotallo de menor longitud y poca producción de raíces) en parte debido posiblemente a que la consistencia líquida del medio de cultivo contribuyó al incremento de la humedad relativa dentro de contenedor. Otro factor que también pudo haber favorecido el fenómeno de hiperhidricidad fue el tiempo de inmersión por siete minutos que resultó al parecer excesivo y pudo tener más



efecto incluso que el número de inmersiones, por tanto, en futuros estudios será necesario determinar el tiempo de inmersión más adecuado para recipientes con capacidad de 250 ml de medio de cultivo. Böttcher y col., 1988 citados por Barceló (2003), señalan que existe una clara conexión entre disponibilidad de agua en el medio, atmósfera del contenedor y la vitrificación y ésta última es siempre mayor en medios líquidos que en sólidos como lo comprobaron en diferentes cultivos como *Betula pendula*.

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

Barceló (2003), menciona que Pácques y Boxus (1987), definieron dos tipos de vitrificación según la consistencia y anchura de las hojas: vitrificación “suculenta” y vitrificación “no suculenta”. En el sistema de propagación por inmersión temporal se ajusta al tipo de vitrificación suculenta.

## **4.2 Embriogénesis indirecta**

### **4.2.1 Fase de iniciación de callos**

En los medios de cultivo con la concentración de las sales MS al 50% con 1, 2, y 3 mg/l de 2, 4- D se indujo la formación de callos en porcentajes promedios de 100, 75 y 80% respectivamente. En las variantes que contenían las sales al 100% con las mismas concentraciones de 2, 4-D, la formación de callo fue del 100%. En el medio con las sales reducidas al 50% y con la adición de 0.2 mg/l de BAP y 2 mg/l de IBA no se formaron callos, pero se estimuló la formación de plantas en un 100%; con estas mismas concentraciones de BAP y de IBA pero con las sales al 100% solo el 5 % de los explantes formaron callo, además se estimuló la formación de plantas en un 100% y la formación de raíces con promedios en las dos variantes de medios de cultivo con

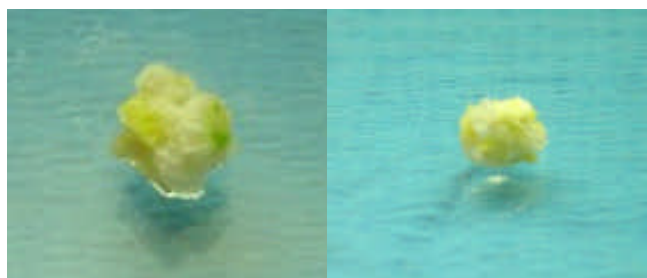
promedios respectivos de respectivos de 65% y 20% por efecto del IBA. Los ápices meristemáticos no formaron plantas en el medio con las sales al 100% más la adición de 3 mg/l de AIA, contrario al efecto que tuvo el medio que se le agregó BAP e IBA que en las dos concentraciones de las sales se formaron plantas. Ver tabla 26.

**Tabla 26.** Porcentaje de iniciación de callos, explantes con raíces y formación de plantas a partir de ápices meristemático en el cultivar Masaya.

Trat. (medios de cultivo)	Concentración de sales MS (%)	2,4-D (mg/l)	BAP (mg/l)	IBA (mg/l)	Variables		
					Formación de callos (%)	Formación de plantas (%)	Explantes con raíces (%)
1	50	1.0	0.0	0.0	100±0.0	5±5	0.0±0.0
2	50	2.0	0.0	0.0	75±9.93	35±10	0.0±0.0
3	50	3.0	0.0	0.0	80±9.18	25±9.93	0.0±0.0
4	50	0.0	0.2	2.0	0.0±0.00	100±0.00	65±10.9
5	100	1.0	0.0	0.0	100±0.00	20±9.18	0.0±0.0
6	100	2.0	0.0	0.0	100±0.00	25±9.93	0.0±0.0
7	100	3.0	0.0	0.0	100±0.00	0±0.0	0.0±0.0
8	100	0.0	0.2	2.0	5.0±5.00	100±0.0	20±9.18

Medias ± Error estándar

Concentraciones de 0.2 mg/l de BAP y 2 mg/l de IBA recomendadas para la inducción de callos en tejidos de quequisque no fueron efectivas para el cultivar en estudio. Un aspecto a destacar en la comparación de las dos concentraciones de las sales MS, es que al 100% de su concentración se forman callos friables y al 50% de las sales los callos son acuosos. En la figura 21 se observan callos formados en la fase de iniciación.



**Figura 21.** Izquierda, y derecha callos friables a los 30 días de permanecer en el medio de cultivo, color amarillo callos friables color crema, callo no friable.

Dottin (2000), utilizando ápices como explantes, obtuvo los mejores resultados para la inducción de callo, en el medio MS con 2 mg/l de 2, 4-D, con un promedio de 40% de callos formados. Este resultado se explica porque al entrar en contacto los explantes con

el 2, 4-D excretan el hidrógeno hacia la pared celular, conduciendo a la descomposición de los lípidos y a la acidificación de la misma, además de la ruptura de los puentes de hidrógeno se observen iones de potasio, provocando una disminución del potencial de agua en la célula de forma tal que esta penetra y la célula se expande.

Nyochemberg y Garton (1998), en quequisque para la iniciación de callos emplearon explantes de brotes axilares y pecíolos extraídos de plantas de 3-5 cm que crecieron en invernadero. Los callos de pecíolos fueron respondiendo significativamente mejor que los formados de brotes cuando se utilizó un medio MS conteniendo 1.36  $\mu\text{M}$  de dicamba. Gupta (1985), en este mismo cultivo, reporta buenos resultados con el medio de iniciación recomendado por Abo El-Nil y Zettler (1976), conocido como AZ suplementado con 2.0 mg/l de ANA empleando como tejidos meristemas apicales extraídos de plantas madres.

Jiménez (1995), determinó que en caña de azúcar (*Saccharum spp*) es necesario la presencia de 2,4-D para la formación de embriones somáticos debido a que juega un rol fundamental en los procesos de desdiferenciación, inducción de callo y la formación de las células embriogénicas de un gran número de especies.

Pliego y Barceló (2001), destacan que en la fase de iniciación de callo se utiliza una alta concentración de auxina, normalmente 2,4-D o una combinación de auxina- citoquinina. Con el objetivo de estimular la división celular e inducir en las células competencia embriogénica. George (1993), afirma que en el proceso de embriogénesis somática frecuentemente se inicia en el medio conteniendo altos niveles de auxinas (especialmente 2,4-D) pero los embriones no desarrollarán más hasta que la concentración de auxinas es reducida.

De acuerdo con Barceló (1995), la auxina puede provocar el crecimiento de los callos debido al efecto sobre el metabolismo del ARN por la inducción de transcripción de moléculas específicas de ARN mensajero. La respuesta embriogénica del callo depende

del genotipo. Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros no responden en el mismo medio (Litz, 1984).

#### 4.2.2 Fase de multiplicación de callos

Para este estudio se probaron cuatro de las mejores variantes de medios de cultivo estudiadas por Gupta (1985) y Dottin (2000).

En los tratamientos 2, 3 y 4 no se observaron callos muertos, mientras que en el medio con agua de coco al 5 % más 0.4 mg/l de kinetina el 10 % de los callos murieron a los 30 días.

Callos con mayores puntos de crecimiento en el 50 % de los tejidos se formaron en el medio con 2 mg/l de kinetina y 0.2 mg/l de ANA. En el tratamiento 2 se logró el mayor porcentaje en volumen de crecimiento con el 30 % en las escalas 4 y 5; no obstante, el medio con 2 mg/l de kinetina y 0.2 mg/l de ANA el porcentaje de explantes que alcanzaron el desarrollo de callos escalas 2 y 3 fueron de 40 y 50 % respectivamente. Ver tabla 27.

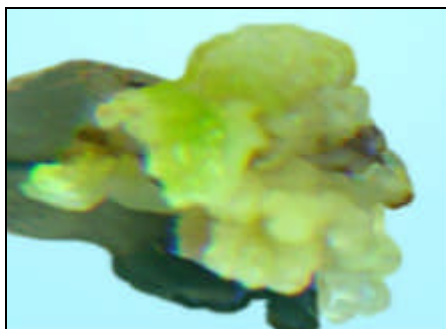
**Tabla 27.** Porcentaje de formación de callos en la fase multiplicación, de acuerdo a escala de crecimiento\* propuesta por Santana (1982) en el cultivar Masaya, para los diferentes tratamientos.

Tratamientos (medios de cultivo)	Agua de coco (%)	Kinetina (mg/l)	ANA (mg/l)	Escala de crecimiento % de explantes con callos				
				1	2	3	4	5
1	5	0.4	0.0	10 ±6.88	30±10.5	15±8.19	40±11.2	5±5.00
2	10	0.4	0.0	0±0.0	25±9.93	15±8.19	30±10.5	30±10.
3	0.0	2	0.2	0±0.0	40±11.2	50±11.5	10±6.88	0±0.0
4	0.0	2	2	0±0.0	60±11.2	15±8.19	25±9.93	0±0.0
Medias ± Error estándar								

\* Escala propuesta por Santana (1982)

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

La figura 22 muestra el aspecto de los callos en crecimiento en la fase de multiplicación.



**Figura 22.** Callos en crecimiento en la fase de multiplicación.

El porcentaje de callos que presentaron un crecimiento reducido, fue debido posiblemente a lo señalado por Pliego y Barceló (2001), de que en las masas de células proembriogénicas, la división celular tiene lugar en las regiones más superficiales, mientras que en las células centrales altamente vacuolizadas entran en fase de senescencia. En el medio que se agregó la combinación de kinetina y agua de coco al 10 % el crecimiento de los callos fue mejor de acuerdo a los valores de la escala 4 y 5.

El efecto del agua de coco en el crecimiento de los callos es debido a que contiene difenilurea, auxina, ribósico de zeatina y vitaminas que llevan a cabo una serie de reacciones catalíticas en el metabolismo de la célula vegetal que influyen en el proceso de la embriogénesis (Roca y Mroginski, 1991).

#### **4.2.3 Fase de formación de embriones somáticos**

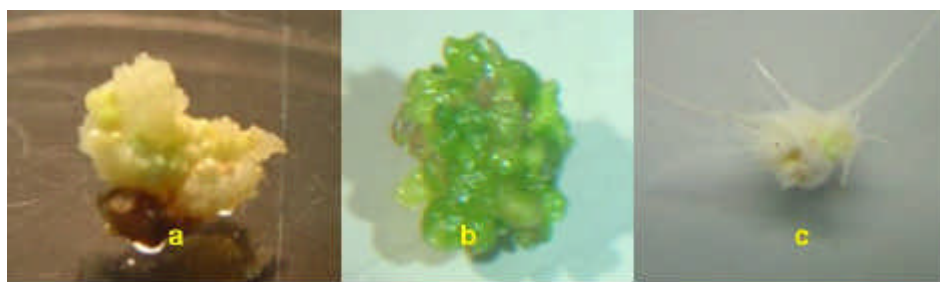
Los callos que formaron el 75% de embriones globulares se observó en el medio suplementado con 30 mg/l de AIA, mientras que los menores porcentajes se presentaron en los medios que se redujo la concentración de AIA a 20 y 25 mg/l con porcentajes respectivos de 55 y 30 %. El número de embriones globulares fue superior en el medio con 30 mg/l de AIA con promedio de 10.15 y con 25 mg/l de AIA el promedio resultó inferior con 1.60 embriones. Se observó que el porcentaje de callos que emitieron raíces fue mayor en el medio con 20 mg/l de AIA con porcentaje de 50% y menor en el medio sin AIA con el 10%. Ver tabla 28.

**Tabla 28.** Resultado de la formación de embriones somáticos en el cultivar Masaya por efecto de diferentes medios de cultivos. Letras iguales no difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con  $\alpha = 0.05$ .

Tratamientos (medios de cultivo)	AIA (mg/l)	Sacarosa (g/l)	Variables		
			Callos con embriones globulares (%)	Número de embriones globulares	Callos con raíces (%)
1	0.0	50	70±10.5	4.30 b	10±6.88
2	20	50	55±11.4	4.15 b	50±11.5
3	25	50	30±10.5	1.60 b	20±9.18
4	30	50	75±9.93	10.15 a	30±10.5

Medias ± Error estándar

Las diferentes formas con que se observaron los embriones se muestran en la figura 23.



**Figura 23.** a y b) Embriones globulares c) Callos embriogénicos con raíces.

Los resultados en este estudio no coinciden con los obtenidos por Dottin (2000), en cuanto al número de embriones globulares por callo, con el mejor tratamiento reporta un número promedio de 34.20 por callo cuando utilizó el medio MS suplementado con 50 g/l de sacarosa y 30 mg/l de AIA.

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

#### 4.2.4 Fase de maduración de embriones somáticos

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

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

Con un promedio de 7 embriones globulares producidos por callo en el medio sin reguladores de crecimiento resultó superior estadísticamente únicamente al promedio de 2.35 obtenido en el medio que contenía 0.1 mg/l de AIA y 0.1 mg/l de BAP. La combinación de AIA-BAP favoreció la maduración de embriones maduros, superando estadísticamente al promedio alcanzado en los demás tratamientos. La adición de 2,4-D con BAP incrementó el porcentaje de callos que formaron raíces en el 93.75%; un promedio intermedio del 65% se registró en el medio con AIA y BAP, ligeramente superior al porcentaje de 50% de callos con raíces producidas en el medio sin reguladores de crecimiento. Ver tabla 29.

**Tabla 29.** Resultados en la maduración de embriones globulares en el cultivar Masaya por efecto de diferentes medios de cultivos. Letras iguales no difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con  $\alpha = 0.05$

Trat. (medios)	2,4-D (mg/l)	AIA (mg/l)	BAP (mg/l)	Variables		
				Embriones globulares	Embriones maduros	Callos con raíces (%)
1	0.0	0.0	0.0	7.00 a	0.62 b	50.00±11.4
2	0.01	0.0	0.1	3.87 ab	0.62 b	93.75±5.00
3	0.0	0.1	0.1	2.35 b	1.80 a	65.00±10.9

Medias ± Error estándar

En la figura 24 a, b y c se observan diferentes tipos de respuesta de los tejidos a los medios de cultivos.



**Figura 24.** a) embriones en estado cotiledonar b) embriones maduros, c) explantes con formación de raíces

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

En el cultivar Masaya los resultados indican que en el medio que no se le adicionó reguladores del crecimiento, se incrementó el número de embriones globulares pero la cantidad media de embriones maduros fue menor. También se comprobó que la combinación de AIA - BAP resultó más efectiva para la maduración de los embriones que la combinación de 2,4-D y BAP. Al parecer la adición de AIA para la formación de embriones somáticos provocó un efecto residual en los tejidos, que se expresa en la siguiente fase de maduración donde los callos produjeron raíces, aún cuando los medios de cultivos contenían bajas o ninguna concentración de auxina.

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

Gómez (1988), destaca que medios de cultivo con 2,4-D, generan masas proembriónicas, pero inhibe el desarrollo de los embriones en etapas posteriores a la inducción, más allá de la etapa globular. Shoot (1997), en plátano (*Musa* spp.) encontró que los embriones maduraron sin 2,4-D germinando el 60% de ellos y con la adición de 2,4-D, la germinación fue del 15%.



#### 4.2.5 Fase de germinación de embriones

El porcentaje de plantas germinadas fue superior en los medios que se le agregó 0.2 y 0.3 mg/l de BAP con el 70 y el 75% respectivamente. El número de plantas promedio no presentó diferencias estadísticas entre los tratamientos. Sin embargo, en el medio testigo se presentaron resultados inferiores reflejando con ello que en el cultivar Masaya es necesario la adición de citoquininas para la formación de plantas. Ver tabla 30.

**Tabla 30.** Porcentaje de plantas del cultivar Masaya germinadas a partir de embriones globulares en diferentes medios de cultivos, cultivar Masaya. Letras iguales no difieren estadísticamente entre sí, para la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con  $\alpha = 0.05$

Tratamientos (medios de cultivo)	BAP (mg/l)	Sacarosa g/l	Variables	
			Plantas germinadas (%)	Número de plantas
1	0.0	30.0	50±11.5	1.05 a
2	0.1	30.0	45±11.4	1.10 a
3	0.2	30.0	70±10.5	1.55 a
4	0.3	30.0	75±9.93	1.80 a

Medias ± Error estándar

En la figura 25 se muestra plantas formadas a partir de embriones globulares.



**Figura 25.** Planta formada a partir de embriones globulares maduros.

Liu (1997), dice que la incorporación de citoquininas suelen ser determinantes en el proceso de germinación de embriones; durante la fase de histodiferenciación compensa el efecto negativo inducido por la auxina sobre el desarrollo de los meristemos.

#### 4.2.6 Enraizamiento

Las plantas enraizadas respondieron satisfactoriamente al experimento. En la tabla 31 se muestran los resultados obtenidos para cada una de las variables evaluadas. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para las mismas variables en la fase de enraizamiento de organogénesis directa.

**Tabla 31.** Resultados en promedio por planta, cuatro semanas después de enraizadas.

<b>Variables</b>	<b>promedios</b>
Longitud de planta (cm)	2.87
Número de hojas	3.20
Número de raíces	5.87
Número de brotes	2.33

#### 4.2.7 Aclimatización

Las plantas aclimatizadas presentaron 90% de sobrevivencia. Para las variables evaluadas los resultados obtenidos se muestran en la tabla 32.

**Tabla 32.** Resultados en promedio por planta, cuatro semanas después de aclimatizadas.

<b>Variables</b>	<b>promedios</b>
Longitud de planta (cm)	3.24
Número de hojas	2.92
Diámetro de pseudotallo (mm)	3.58

En las fases de enraizamiento y de aclimatización no se observaron variantes genéticas reportadas por muchos autores, elemento importante, porque con el proceso de embriogénesis se puede potenciar el empleo de técnicas de inmersión temporal para incrementar los coeficientes de multiplicación, que se sabe superan a la micropropagación. Otra la importancia que adquiere la embriogénesis somática, es el empleo de los tejidos no diferenciados en la transformación genética de este cultivo. En la figura 26 se aprecian las plantas aclimatizadas



**Figura 26.** Plantas obtenidas de fase de aclimatización a los 30 días.

## **V. CONCLUSIONES**

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio realizado se puede llegar a las siguientes conclusiones:

### **5.1. Organogénesis directa**

En las diferentes fases de la organogénesis directa el cultivar Masaya mostró una respuesta diferente de los explantes, tanto a medios de cultivos como a la fuente de procedencia de los explantes iniciales.

1. El cultivar Masaya en la fase de establecimiento a los 30 y 45 días con ápices extraídos de yemas terminales del cormo madre, se formaron mayores porcentajes de plantas en los medios suplementados con 1 mg/l de AIA más 1 mg/l de BAP; a los 60 días se mantuvo la tendencia a responder mejor con el mismo medio y con 2 mg/l de BAP. Con ápices extraídos de yemas axilares la formación de plantas a los 30 días se favoreció en el medio que contenía 0.5 y 1 mg/l de AIA con 1 mg/l de BAP, y a los 45 días con 1 mg/l de AIA combinado con 1 mg/l de BAP y con 2 mg/l de BAP sin auxina y por último a los 60 días el porcentaje de plantas formadas se incrementa en los medios suplementados con 1 y 2 mg/l de BAP con o sin AIA.
2. El cultivar Masaya con plantas que se formaron a partir de yemas terminales en la fase de multiplicación, en el primer subcultivo se obtuvieron los mayores promedios de brotes axilares en los medios que contenían dosis de 1 mg/l de BAP con o sin AIA; mientras que en el segundo y tercer subcultivo la brotación fue mayor con la adición de 0.50 mg/l de AIA más 2 mg/l de BAP y con 0.0 y 0.25 mg/l de AIA más 3 mg/l de BAP respectivamente. Con yemas axilares en el primero y segundo subcultivos se obtuvieron los mayores promedios de brotación con 0.0 mg/l de AIA y adicionado con 1 ó 3 mg/l de BAP; en el tercer subcultivo con 0.25 mg/l de AIA más 2 mg/l BAP.

3. En la fase de enraizamiento, la emisión de raíces a partir de plantas regeneradas de yemas terminales fue mayor en el medio de cultivo de consistencia líquida con las sales reducidas en su concentración al 50%, aunque fue estadísticamente similar a las raíces producidas en el medio sólido con las sales al 100%. En plantas regeneradas de yemas axilares la producción de raíces fue mayor en el medio líquido con las sales al 50%, y de consistencia sólida con las sales al 100 % y 1 mg/l de AIA.
4. En la fase de aclimatización, el cultivar Masaya con plantas provenientes de yemas terminales y previamente enraizadas en un medio líquido con las sales MS al 100%, la sobrevivencia fue del 100%; con plantas propagadas de yemas axilares el porcentaje de sobrevivencia fue mayor con un 96% en el medio de consistencia líquida con la sales al 100% y en los medios con las sales al 50 % y en las dos consistencias la sobrevivencia fue del 96%.
5. Para el efecto de densidad de explantes por contenedor, el cultivar Masaya con plantas formadas a partir de yemas terminales como de yemas axilares, los promedios de brotación axilar fueron mayores cuando se inocularon 4 explantes por contenedor con volumen de 200 ml.
6. Con el sistema de inmersión temporal automatizado (RITA) el cultivar Masaya con plantas regeneradas a partir de yemas terminales fue mayor el promedio de brotación axilar, con frecuencia de 3 inmersiones por día durante 7 minutos, pero propició el efecto de hiperhidricidad principalmente en las hojas de las plantas. Con plantas obtenidas a partir de yemas axilares la brotación axilar fue mayor con frecuencia de 2 inmersiones por día durante 7 minutos, no así el efecto de hiperhidricidad que fue menor.

## 5.2. Embriogénesis indirecta

1. En el cultivar Masaya, la relación mayor porcentaje de formación de callos y menor formación de plantas se obtuvo en el medio constituido por las sales MS al 100 % con 3 mg/l de 2,4-D.
2. En la fase de multiplicación, el mayor porcentaje de callos en crecimiento se formaron en el medio que se le adicionaron 10 % de agua de coco y 0.4 mg/l de kinetina.
3. En la fase de formación de embriones somáticos, en el medio con 30 mg/l de AIA se obtuvo el mayor porcentaje embriones globulares en un 75% y mayor número de embriones globulares promedios.
4. En la fase de maduración de embriones, el mayor promedio de embriones globulares maduro se obtuvo en el medio que se le agregó 0.1 mg/l de AIA y 0.1 de BAP.
5. En la fase de germinación de embriones el mayor porcentaje de plantas formadas se alcanzó cuando se adicionó 0.3 mg/l de AIA.
6. En la fase de enraizamiento el número de raíces promedio, fue de 5.87 similar al comportamiento de organogénesis directa.
7. En la fase de aclimatización el porcentaje de sobrevivencia de plantas fue del 90%.

## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Adicionar BAP en combinación con AIA cuando se utilicen ápices extraídos tanto de yemas terminales como de yemas axilares en las fases de establecimiento y de multiplicación.
2. De acuerdo a la dinámica de crecimiento observada en la fase de establecimiento los ápices extraídos tanto de yemas terminales como de yemas axilares, pueden ser divididos longitudinalmente en dos partes y transferidos a un medio de multiplicación entre las 2 y 3 semanas de establecidos.
3. Realizar estudios que permitan controlar, en recipientes (RITA) los efectos de hiperhidricidad en las plantas, considerando el tiempo y frecuencia de inmersión, el contenido de citoquininas y la concentración de las sales en el medio de cultivo.
4. Estudiar el efecto en la tasa de brotación axilar en la fase de multiplicación con contenedores de diferentes volúmenes.
5. Realizar estudios de embriogénesis somática haciendo uso de los recipientes de inmersión temporal automatizada.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo El-Nil, y M. M. 1976.** Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Plant Sci. Lett.* 9: 259-264.
- Agramonte, D., Jiménez, F. y Dita, R. 1998.** Propagación y Mejora Genética de plantas por biotecnología. En: *Aclimatización.* (ed) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba: pp. 193- 206.
- Altamirano A M, Acuña R. E. 2000.** Comportamiento en condiciones de Masaya de plantas de quequisque (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schoot) en la comunidad de Masaya, obtenida de tres técnicas de propagación. 35p. Trabajo de tesis.
- Bancroft, R. D y F. D. McDonald. 1998.** *Plant Tissue Culture Manual.* CARADI, Cave Hill Campus, P.O Box 64, Barbados, 1-6.
- Blanco, M. 1992.** Raíces y tubérculos. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. P. 81 – 125.
- Barceló et al. 1995.** Fisiología vegetal. Ciencias y técnicas. Ediciones Pirámide S.A. Séptima edición. P. 120-320.
- Bewley, J y Black, M. 1985.** Seed physiology of development and germination. Plenum, New York. P .101.
- Böttcher et al. 1988.** Induction and reversion of vitrification of plants cultured in vitro *physiol. Plant.* 72, 560-564.
- Caldera, L. 2002.** Mejoramiento de la eficiencia de la propagación *in vitro* de plátano (*Musa sp* cv. Enano). Trabajo de diploma para Ingenero agrónomo. 41p.
- Dottin, M. P. 2000.** Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas, Cuba.119 p.
- Debergh, P. C y L. J Maene, 1981.** Ascheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Scientia Hort* 14:335-345.
- Debergh, P. C. 1988.** Micropropagation of wody species-state of the art on in vitro aspects. *Acta Hort.* 227, 287-295.
- Dublín, P. 1991.** Multiplicación vegetativa de café y cacao. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura.* Roca W.M y Mroginski, L.A, eds,26:278-619.
- Escalona M, et al. 1999.** pineapple (*Ananas Comosus* (L) Merr). Micropropagation in temporary immersion System. *Plant Cell Reports.*
- Evert, D. R y Holt M. A. 1975.** Aseptic culture of chrysanthus in the plant propagation class. *Comb. Proc. Int. Plant. Prop. Soc.* 25, 444-447.
- Fujimura, T. y Komamine, A. 1980.** The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *New Physiol.* 64. p.162-164.



- Garcia M. 1997** Tecnología para la micropropagación de la malanga: una solución al rescate de este cultivo en Cuba. BIOVEGE' 97, Ciego de Avila, libro de resúmenes, Cuba.
- García, M. 1999.** Tecnología para la micropropagación de la malanga: una solución al rescate de este cultivo en Cuba. Libro de resúmenes BIOVEG-97. Ciego de Ávila, Cuba.
- George, E. 1993.** Plant propagation by tissue culture. The Technology. (ed). Exegetics Limited, Edington, Wilts, England. 9-65.
- George, E. F y P. D. Sherrington. 1984.** Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories Exegetics Limited, Edington, Wilts, England. 118 -210.
- Gómez, K. 1998.** Embriogénesis somática. En: Propagación y Mejora Genética de plantas por Biotecnología (ed) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba, pp. 57-79.
- Gilliard, T. 1999.** Embriogénesis somática en medios líquidos en el cultivar híbrido FHIA-(AAAB). Tesis de Maestría, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba. 70 pág.
- Gupta, P. P, 1985.** Plant regeneration and variabilities from tissue culture of cocoyam (*X. sagittifolium*) and (*X. violaceum*). Plant Cell Report 4:88-91.
- Hartmann, H y Kester, D. 1991.** Propagación de plantas: Principios y prácticas. Ed. Continental, VI impresión. México: pp. 220-235.
- Hartman, H y Kester, D. 1994.** Propagación de plantas: Principios y prácticas. Ed. Continental, VI impresión. México: pp. 220-235.
- Hu, C. y Wang. 1983.** Meristem, shoot tip and bud cultura. En: Evans D. A. Sharp W. R, Ammirato, P. V. (Eds) Handbook of plant cell culture, Vol. Techniques for Propagation and breeding. MacMillan, New, p. 177-277.
- INTA (Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria), 2000.** El cultivo del quequesque. Guía tecnológica, Managua, Nicaragua, 25 p.
- Jiménez G E. 1995** Producción in vitro de caña de azúcar (*Sacharum spp* híbrido). Tesis de doctorado. Instituto de biotecnología de las plantas, Universidad Central de las Villas, Santa Clara. 99p.
- Jiménez, G. E. 1998.** Propagación y Mejora Genética de plantas por biotecnología. En Cultivo de ápices y meristemas. (ed) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba: pp 45-46.
- Krikorian, A. D. 1991.** Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivadas de cultivo *in vitro*. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. (Eds) W. M. Roca, Mroginski. Cali, Colombia: pp 314-338.
- Larkin, P. y W. Scowcroft. 1981.** Somaclonal variation- a novel source of variability from cell culture for plant improvement, Theor Appl Genet, 60: 197-214.

- Lindsey, K., y Jones, M. G. K. 1992.** Biotecnología Vegetal Agrícola. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 276 p.
- Litz, R. E. 1984a.** *In vitro* somatic embryogenesis from callus of jaboticaba. Myrciaria, Califlora. Hort Science. 19. 62-64.
- Litz, R. E. y Jarret, R. L. 1991.** Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones (eds) Roca, W. Y Mrognisk, L. Cali, Colombia : pp 143 – 172.
- Liu, J. 1997.** Culture of callus and protoplasts of Tanier (*Xanthosoma* ssp.) en Puerto Rico. University of Puerto Rico, Mayagüez Campus 2:20-26.
- López , M. , E. Vásquez y López , R. 1995.** Raíces y Tubérculos.(eds) R, Ojeda; González, L. Y Mora L. La Habana,Cuba: pp 98-221.
- Merkle, S.; Parrot W. and Flinn, B.1966.** Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: *In vitro* embryogenesis in plant. (eds) Thorpe. T. pp 155-203.
- Moller, E., T. Brown, S and H, Lorz. 1998.** DNA variation in tissue culture derived rice plants. Theor Appl Genet., 80:673-679.
- Monge M. et al. 1987.** Obtención de plantas de Tiquisque blanco, morado y ñampi libres de virus promedio del cultivo *in vitro* de ápices. Agronomía Costarricense 11 (1) 71 – 79.
- Murashige, T. y F. Skoog .1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant.15:473-497.
- Murashige, T. 1974.** Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plant physiol. 25: 135 – 166.
- Novak, P. J. 1980.** phenotype and cytological status of plants regenerated from callus cultures of *allium sativum* L. Z. Pflanzenzucht 84, 250-260.
- Nyochembeng, L. y Garton, S. 1998.** Plant regeneration from cocoyam callus derived from shoot tips and petioles. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53:127-134.
- Onwueme I C, Charles W. B. 1994.** Tropical root and tuber crops. Production, perspectives and future prospects. Plant production and protection pepper. 126. Food and Agriculture Organization of the United Nations p. 55. Rome.
- Orellana, P. 1998.** Introducción a la micropropagación masiva. p. 151-178. En Ponce, J (Ed.). Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología.- Santa Clara. IBP, -390p.
- Orellana, P. 1998.** Introducción a la micropropagación masiva. En Propagación y Mejora Genética de las plantas por biotecnología (e d) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba: pp 151 -178.

- Paques M. Boxus P. H; y Dulos M; 1987.** Vitrification: and inducible and reversible phenomenon. *Acta Hort.* 212: 253-258.
- Parrot, W., Dryden, G., Vogt,; Hidebrand,D.,Collins, G. y Williams, E. 1998.** Optimization of somatic embryogenesis and embryo germination in soybean. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 24.p.817.
- Pérez, J. N; E. Jiménez y D. Agramonte. 1998.** Aumento de la Eficiencia de la Propagación Masiva: En Propagación y Mejora Genética de las plantas por biotecnología (e d) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba: pp 179 -190.
- Pliego, F. y A. Barceló. 2001.** Morfogénesis *in vitro*. En: Introducción a la Biotecnología Vegetal. Métodos y Aplicaciones. (eds) J. L. Caballero., V. Valpuesta y J. Muñoz. Córdoba, España: pp: 233-242. Córdoba, España: pp 233 – 242.
- Ramírez, P. 1985.** Aislamiento y caracterización del virus del mosaico del “Dasheen” (DMV) en Costa Rica. *Turrialba:* 35:279-283.
- Rodríguez, A. M. 1998.** Establecimiento *in vitro* de malanga (*Xanthosoma sagittifolium*) a partir de ápices libres de macroorganismos y su propagación en un medio biocen. En: Tercer encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal. Resúmenes. La Habana, Cuba: pág 16-117.
- Redway, F. 1993.** Proceeding Caribbean Regional Workshop on tropical root crops. Jamaica, p 99-104.
- Roca, W. M y Mroginski L. A. 1991.** Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. En: Medios de cultivos generalidades, composición y preparación *in vitro*. Editores Técnicos, CIAT, Colombia, 42-70.
- Roca, W. M y Mroginski L. A. 1993.** Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y aplicaciones. En: Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. Editores Técnicos, CIAT, Colombia, 19-40.
- Santana, N. 1982.** Determinación de un medio adecuado para la obtención de callos en variedades de caña de azúcar (*Saccharum* sp.) *in vitro*. *Cultivo de tropicales.* Vol.4, No 3.
- Szabados, L., Mroginski y Roca. 1993.** Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. En: Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones. (eds) Roca, W. Y Mrognisk, L. Cali, Colombia. 8:173-210.
- Schoof, H. 1997.** The origin of embryogenic cells in *Musa*. Catholic University of Leuven, Belgium .98 p.
- Skoog, F. y C.O. Miller 1957.** Chemical regulation of grown and organ formation in plant tissue culture *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.

- Teisson, C. y Alvard, D. 1994.** VIIIth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Pp S2-2.
- Tisserat, B. Esan, E. y Murashige, T. 1979.** Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev. 1. p. 1-78.
- Thorpe., T. A. 1980.** Organogenesis *in vitro*. Structural, physiological and biochemical aspects. y embriogénesis Review of cytology, supplement 11 A: 71-111.
- Thorpe., T. A. 1991.** Establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga (*Xanthosoma* ssp.). (ed) Agronomía costarricense : pp 123-128.
- Tórrez, G. S, y E. Vázquez. 1995.** Fisiología Vegetal. Editorial pueblo y Educación, Plaza, Ciudad de la Habana, 19 – 37: 315- 373.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Materiales y equipos

---

---

Agua destilada	Hidróxido de potasio (KOH)
Agua desionizada	Frasco de vidrio (Capacidad 250ml)
Alcohol	Horno*
Algodón	Marcadores
Bandeja de laboratorio	Mecheros Bunsen
Bandeja de aclimatación (60 orificios)	Masquitake
Autoclave*	Papel aluminio
Balanza analítica*	Pinzas
Bolsas plásticas	Pipetas
Beakers	Regla milimetrada
Papel kraft	Placas petri
Calentador electromagnético*	Peachímetro*
Cámara fotográfica*	Reguladores de crecimientos
Cinta adhesiva	Sacarosa
Cuchillo	Phytigel
Destilador de agua*	Reactivos varios
Desionizador de agua*	Tubos de ensayo
Escalpelo y cuchillas	Humus
Gradillas	Esteriocopio*

---

---

\*Equipos

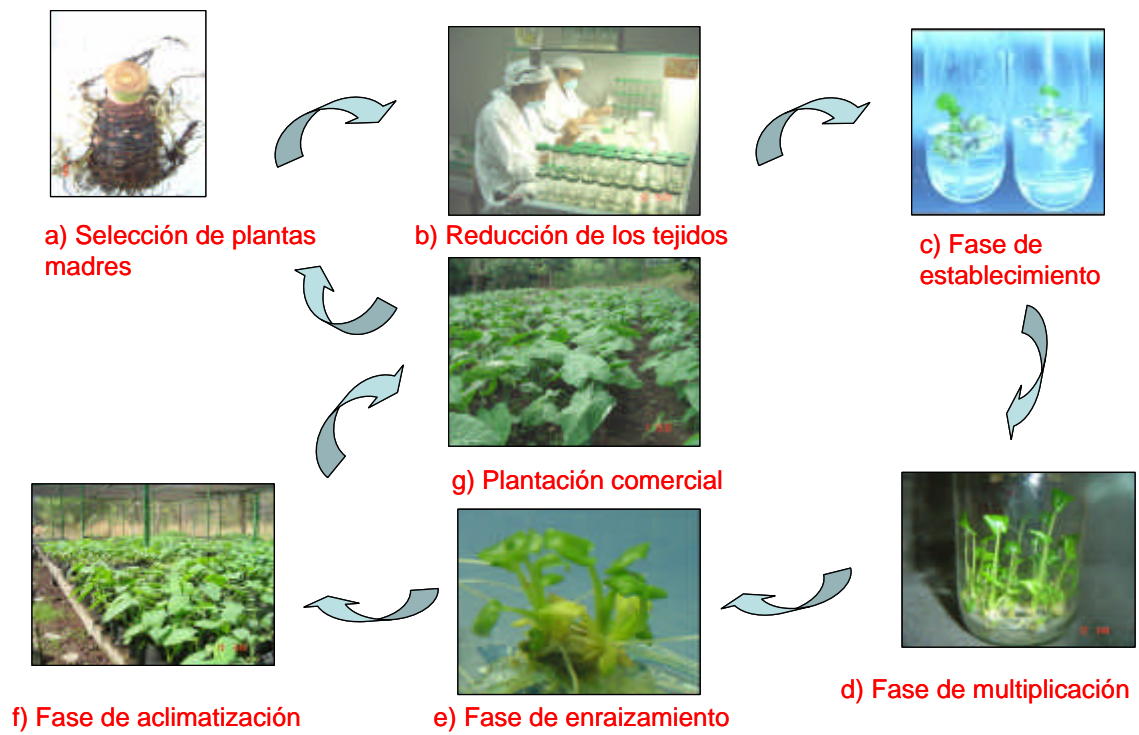
**Anexo 2.** Composición del medio de cultivo base de Murashige y Skoog (1962) utilizado en el laboratorio.

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

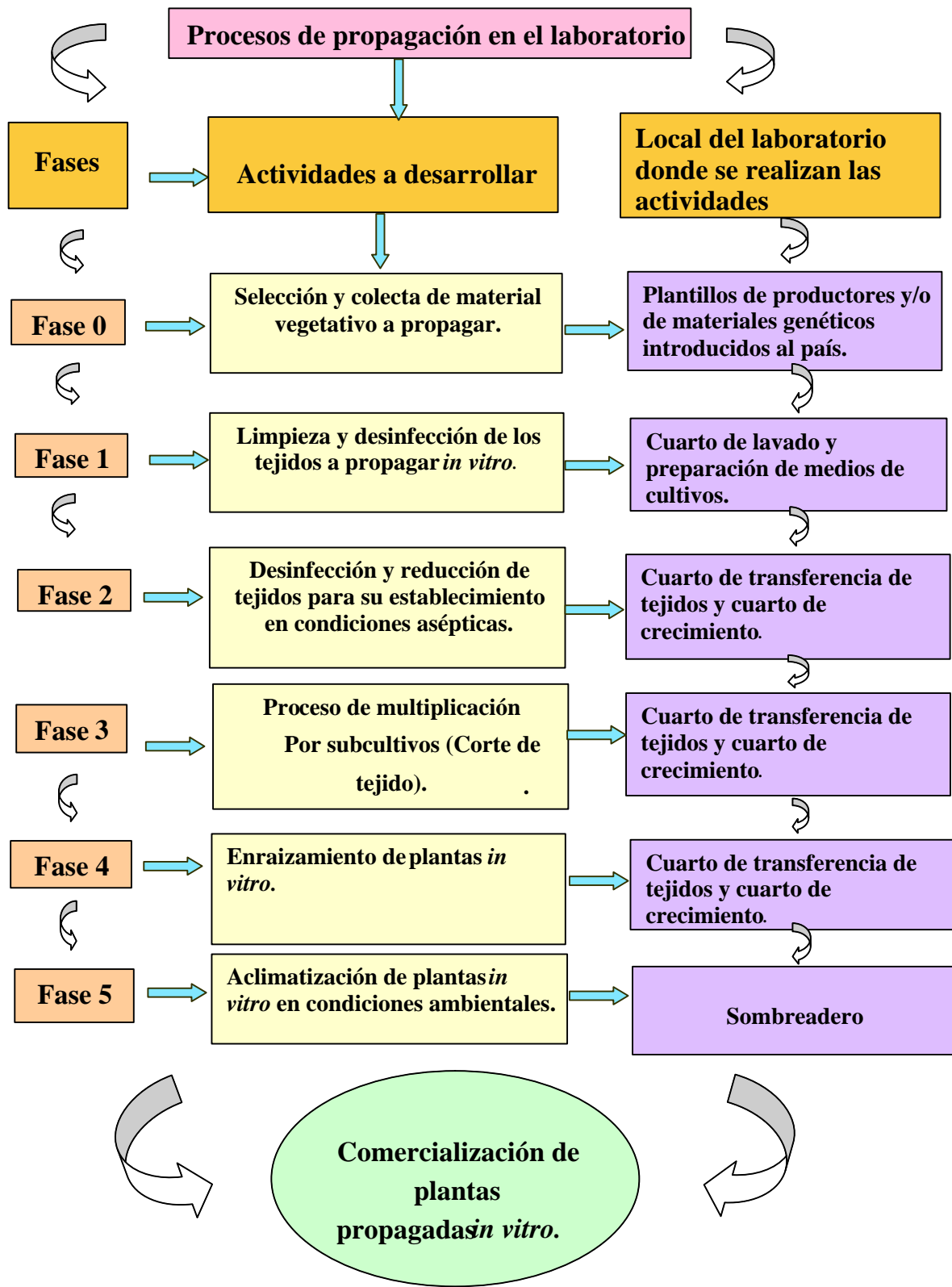
**Anexo 3.** Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) de la Universidad Nacional Agraria.



**Anexo 4.** Proceso de propagación *in vitro* de quequisque.



**Anexo 5.** Fases de producción en el proceso de micropropagación clonal.





**Anexo 6.** Costo de la tesis en el proceso de investigación.

<b>CONCEPTO</b>	<b>CANTIDAD</b>	<b>C/U C\$</b>	<b>COSTO TOTAL C\$</b>
Primer borrador	1	250.00	250.00
Segundo borrador	1	250.00	250.00
Tercer borrador	1	350.00	350.00
Tesis final	3	350.00	1050.00
Tesis corregida	4	350.00	1400.00
CD	2	25	50.00
Disquete	2	8	16.00
fotocopias	-	-	250.00
Alquiler de computadora	-	-	500.00
<b>Costo total</b>			<b>4116.00</b>

<b>Costo de reactivos, de cristalería y materiales de laboratorio</b>				
<b>Nº</b>	<b>Descripción</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Costo Unitario</b>	<b>Costo total</b>
	<b>Reactivos</b>			<b>492.52</b>
1	Medio de cultivo conocido como Murashige y Skoog.	1 frascos	126.66	126.66
2	Phytigel.	1 kg	345.86	345.86
3	Fitohormonas	-	-	20.00
	<b>Cristalería</b>			<b>126.28</b>
4	Gradillas (tube rack) para tubos de ensayos (25 mm para 40 tubos).	2	16.51	33.02
5	Tubos de ensayo (Pirex) de 25 x 150 mm.	40	1.38	55.20
6	Tapones para tapar tubos de ensayos (tube closure)	40	0.14	5.60
7	Frascos para propagación	120	0.072	8.64
8	Beaker de 2 litros.	1	14.60	14.60
9	Beaker de 1 litro	1	9.22	9.22
	<b>Materiales de laboratorio</b>			<b>266.76</b>
10	Alcohol	1 Galón	10.00	10.00
11	Cloro	1 Galón	2.41	2.41
12	Algodón	1 Libra	7.85	7.85
13	Sacarosa	1 kg	1,40	1,40
14	Láminas de aluminio	2	2.11	4.22
15	Plástico de empaque	1 rollo	14.81	14.81
16	Cinta adhesiva	3	0.60	1.80
17	Detergente	1 bolsa	2.41	2.41
18	Bandejas plásticas	2	1.16	2.32
19	Sustrato (humus)	1 qq	5.54	5.54
21	Compra de material vegetativo	100	0.14	14.00
22	Transporte	1 colectas 2 días	75.00	150.00
23	Luz y agua	-	-	50.00
<b>Total \$ US.</b>				<b>885.56</b>

## IX.

## GLOSARIO

<b>Adventicio</b>	Estructura que se origina en un sitio no usual para ella, especialmente en un tejido adulto.
<b>Auxina</b>	Comprende una gran familia de sustancias reguladoras de crecimiento ya sea natural, como el AIA, o sintética como el 2,4-D, el ANA y IBA, que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular, y se cree que promueven la división celular en el cultivo de tejidos.
<b>Citoquinina</b>	Sustancias naturales como la KIN (6-furfuril-aminopurina) y sintéticas como el BAP, cuya función principal es estimular la división celular
<b>Callo</b>	Es un tejido constituido por células parenquimatosas, coherente pero no organizado y amorfo producido por una vigorosa división celular.
<b>Embriogénesis somática</b>	Proceso de iniciación y formación de un embrión a partir de células somáticas.
<b>Embriogénesis indirecta</b>	La formación indirecta de embriones somáticos desde callo o suspensiones celulares.
<b>Esterilización</b>	Es el proceso mediante el cual cualquier material, sitio o superficie se libera completamente de cualquier microorganismo vivo o espora
<b>Explante</b>	Fragmento o tejido excisado de material parental (tejido u órgano) para iniciar un cultivo <i>in vitro</i> .
<b>Friable</b>	Que se desintegra o desmenuza fácilmente, usado para clasificar un tipo de callo con tendencia a la separación de sus células.
<b>Habitación</b>	Capacidad de un cultivo a adaptarse a un cambio o modificaciones.
<b>Hiperhidricidad</b>	Fenómeno que afecta negativamente un cultivo <i>in vitro</i> debido a una alta presión hídrica dentro del contenedor sobre el tejido, explante o plántula ya formada.
<b>In vitro</b>	En un ambiente artificial estéril, típicamente un recipiente de vidrio con medio de cultivo.

<b>Organogénesis</b>	Es la formación adventicia de órganos como tallos, raíces hojas y flores.
<b>Organogénesis directa</b>	Cuando se transfieren al medio de cultivo un explante adecuado, y brotes de tallo, raíces, embriones somáticos y primordios florales se desarrollan directamente del explante sin pasar por el estado de callo.
<b>Subcultivo</b>	División con transferencia de una parte de cultivo a un medio nuevo, generalmente en otro recipiente.
<b>Sustrato</b>	Incluye el efecto de todos los componentes del medio nutritivo
<b>Vitrificación</b>	Presente en la micropropagación, llamada también transformación hiperhídrica, es un desorden fisiológico acumulativo y de origen desconocido que aparece al azar normalmente durante la fase de proliferación y únicamente en plantas no enraizadas. Se aplica a todas las clases de funcionamiento fisiológico alterados, debidos al estado anormal del agua en el contenedor de cultivos