

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA**



Evaluación de la tasa de multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. (Malanga) mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la UNAN-León.

**MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

Presentado por:

Br. Lyudmila Tatiana Blanco Aguilar.

TUTORA: MSc. María Inés Dávila.

ASESOR ESTADÍSTICO: MSc. Milton Carvajal.

Agosto, 2013

“A LA LIBERTAD POR LA UNIVERSIDAD”



❖ AGRADECIMIENTO

Le agradezco **a Dios**, porque fue quien me dio el valor, la perseverancia y la oportunidad de haber podido concluir este sueño en mi vida.

A mi Familia, que me dieron todo el amor, apoyo y la comprensión para la realización de este trabajo.

A mi Tutora MSc. María Inés Dávila, porque me dio toda su ayuda y la orientación necesaria para la realización de dicho trabajo investigativo.

Al MSc. Milton Carvajal, por su colaboración en los análisis estadísticos.

A mis docentes, gracias a cada uno de los maestros que me impartieron clases durante todo el periodo de la carrera, transmitiéndome toda su sabiduría y enseñanza.

A mis amistades, ya que ellos me dieron su colaboración al momento del desarrollo de este trabajo.



❖ DEDICATORIA

A Dios, gracias por la confianza que me transmitiste, por darme la fe necesaria de creer en mí misma y lograr terminar este gran sueño que me propuse de ser toda una profesional.

A mis Padres, gracias por todo el amor que me dieron desde niña, a todo su esfuerzo, paciencia, ayuda y cada uno de los sacrificios que ellos han hecho para darme una buena educación, los adoro con toda mi alma, por ustedes hoy finalice mi carrera y sé que ellos están muy orgullosos de mi:

Sr. Silvio Alejandro Blanco Pérez

Sra. Martha del Pilar Aguilar Pérez

A mi Ángel fuiste parte fundamental, ya que gracias a ti, hoy pude concluir esta etapa en mi vida, nunca olvidare tu consejo “Piensa antes de actuar”.



INDICE

Agradecimiento	i
Dedicatoria	ii
Resumen	iii
I. Introducción	1
II. Hipótesis	4
III. Problema	5
III. Objetivos	6
IV. Antecedentes	7
V. Literatura revisada	9
1. Micropropagación.....	9
1.1 Preparación planta madre.....	10
1.2 Fases del proceso de la Micropropagación.....	10
1.3 Medio de cultivo.....	15
1.3.1 Sales minerales.....	16
1.3.2 pH.....	16
1.3.3 El gelificante.....	16
1.4 Hormonas Reguladoras de Crecimiento.....	17
1.5 Efectos fisiológicos de las hormonas.....	17
2. Generalidades.....	19
2.1 Morfología de la planta.....	19
2.1.1 Cormo.....	21
2.1.2 Hojas.....	21
2.1.3 Inflorescencias.....	21
3. Taxonomía.....	22



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de Colocasia esculenta (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA)

4.	Cultivo de Malanga en Nicaragua.....	22
5.	Pruebas Estadísticas.....	25
5.1	Prueba de Comparación de Dunnett.....	26
5.2	Prueba de Duncan.....	26
VI.	Materiales y Métodos.....	27
VII.	Resultados y Discusión.....	32
VIII.	Conclusiones.....	45
IX.	Recomendaciones.....	46
X.	Bibliografías.....	47
XI.	Anexos.....	51
XII.	Galería de Imágenes.....	53



INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

1	Figura 1 - Malanga y sus partes.....	20
2	Figura 2 - Transferencia de malanga en cámara de flujo laminar.....	27
3	Cuadro 1 - Concentración de los tratamientos.....	28
4	Figura 3 - Preparación de los medios.....	29
5	Figura 4 - Cuarto de autoclave para material del laboratorio.....	30
6	Figura 5 - Incubación de los explantes en el cuarto de crecimiento.....	30
7	Figura 6 - Desarrollo de explantes, 2 semanas de siembra.....	31
8	Cuadro 2 - Prueba de Comparación múltiple de Dunnett entre tratamientos (Evaluación 30 días).....	32
9	Cuadro 3 - Prueba de Comparación múltiple de Dunnett entre tratamientos (Evaluación 60 días).....	33
10	Cuadro 4 - Prueba de Duncan.....	34
11	Cuadro 5 - Prueba de Duncan.....	34
12	Cuadro 6 - Pruebas de Duncan sobre longitud de medias.....	35
13	Figura 7 - Formación de raíces.....	37
14	Figura 8 - Brotes proliferados sin formación de raíces.....	37
15	Figura 9 - Respuesta proliferativa de brotes.....	38
16	Cuadro 7 - Análisis de la varianza entre tratamientos.....	40
17	Gráfica 1 - Diagrama de cajas comparativo por días y tratamientos.....	41
18	Gráfica 2 - Diagrama de comparación de medias.....	42
19	Gráfica 3 - Diagrama de la Tasa de proliferación.....	43
20	Gráfica 4 - Comparación de longitud de brotes en cm.....	44
21	Tabla 1 - Composición de los medios de Murashige-Skoog (1962).....	52
22	Figura 10 - Iniciación del material.....	53
23	Figura 11 - Respuesta positiva de los explantes.....	53



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de Colocasia esculenta (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA)

24	Figura 12 - Preparación del medio MS.....	54
25	Figura 13 - El medio se vierte en los frascos.....	54
26	Figura 14 - Realización de los cortes.....	55
27	Figura 15 - Iniciación del tiempo de evaluación.....	55



RESUMEN

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejido de la UNAN-León, con la especie *Colocasia esculenta* (L.) Schott (Malanga). En esta investigación se evaluó la multiplicación de explantes de malanga en diferentes condiciones de cultivo, con el uso del medio de Murashige y Skoog (1962), enriquecido con los medios a diferentes concentraciones de hormonas Benzilamino purina (BAP) y Acido Indol acético (AIA). Los tratamientos a evaluarse fueron: T1- testigo, T2- 0.5mg/l de BAP-0.025mg/l de AIA; T3- 1mg/l de BAP- 0.05 mg/l de AIA; T4- 1.5mg/l de BAP- 0.075mg/l de AIA; T5- 2mg/l BAP- 0.1 mg/l de AIA; T6- 0.5mg/l de BAP- 0.25mg/l de AIA; T7- 1 mg/l BAP- 0.5mg/l de AIA; T8- 1.5mg/l de BAP- 0.75mg/l de AIA y T9- 2mg/l de BAP- 1mg/l de AIA, la toma de datos fueron hechos a los 30 y a los 60 días. Donde se evaluaron los efectos de los diferentes medios de cultivos, la siembra se inició con brotes de malanga de longitud promedio (brotes de 1.5cm), las variables a usar fueron la tasa de proliferación, longitud de brotes e inducción en la formación de raíces. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante, La Prueba de Comparación Múltiple de Dunnet y la Prueba de Duncan, utilizando el paquete estadístico SPSS 15. Los resultados demostraron que el T3 (1mg/l de BAP- 0.05mg/l de AIA) obtuvo la mayor tasa de proliferación con un valor de 5.35 a los treinta días de cultivo. La mayor longitud de brotes se obtiene en el T1 (testigo) con un valor de 4.89 cm. en ausencia de reguladores de crecimiento. Únicamente en el testigo se logra inducir la formación de raíces.



I. INTRODUCCIÓN

La malanga *Colocasia esculenta* (L.) Schott pertenece a la familia de las Aráceas es de origen americano, se encuentra desde México hasta Brasil, fue cultivada por los aborígenes de Las Antillas y del resto del continente antes del descubrimiento (López et al., 1995). Tiene un alto valor nutritivo, (23–60% de carbohidratos), como alimento tiene una utilización muy variada; es utilizado como sustituto de la papa en sopas, contiene vitamina C y hierro. Es un excelente alimento por su contenido de proteína. (Taracena, 2004).

Sus cormelos son consumidos ya fueran cocidos, fritos o como harina para algunos usos. Es utilizado como sustituto de la papa en sopas o un alto contenido de tiamina y riboflavina. (Saucedo et al. 2007).

La malanga tiene un gran valor en su producción agrícola como producto de exportación, pero esto se mejoraría con ayuda de los agricultores para que ellos introdujeran esta especie y se lograra un mayor desarrollo.

La Micropropagación permite la obtención de material libre de agentes contaminantes durante un periodo corto de tiempo. Se inicia a partir de un fragmento (explante) de una planta seleccionada, de la cual se obtiene una descendencia uniforme. (Quiroz y Mendoza, 2001)



Diversos clones de malanga son propagados usando la técnica del cultivo *in vitro* vía organogénesis directa, a través de yemas axilares (García et al., 1999) siendo un método confiable para lograr un proceso de proliferación repetible y libre de agentes contaminantes. (Orellana, (1998). En algunos países, el uso del cultivo *in vitro* realmente puede ser utilizado para apoyar programas de mejoramiento genético (Ocampo y Nuñez, 2007).

El objetivo de esta investigación fue el de realizar la multiplicación de explantes de la especie malanga, adicionándole diferentes concentraciones de hormonas reguladoras de crecimiento: auxina y citoquinina. Estas hormonas de forma conjunta logran tener efectos adversos, ya que en dependencia de la concentración de cada una de ellas ayudan al desarrollo de raíces o estimula la elongación y división celular.

Por medio de esta investigación experimental se ha permitido disponer de un protocolo optimizado que contribuya a la multiplicación *in vitro* y por lo tanto ayude al desarrollo de la agricultura obteniendo mayor disponibilidad de material de siembra de calidad, tanto para los agricultores como productores a fin de que mejore la producción de su cosecha.

El cultivo de malanga es una fuente importante de alimento, la producción generaría ingresos en diversas regiones tropicales de centro América. Este es un producto que posee gran potencial de comercialización



Evaluación de la tasa de multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

tanto en el mercado nacional e internacional. La realización de este presente trabajo servirá como una herramienta útil para la producción *in vitro* de malanga para productores y exportadores de este rubro.



II. HIPÓTESIS

- **Ho:** No existe diferencia significativa en la tasa de proliferación según el balance de las hormonas reguladoras de crecimiento de BAP- AIA.

- **Ha:** Existe diferencia significativa en la tasa de proliferación según el balance de las hormonas reguladoras de crecimiento de BAP- AIA.



III. PROBLEMA

¿Cuál de las concentraciones establecidas de hormonas reguladoras de crecimiento llegaría a ser la más efectiva para obtener una alta tasa de multiplicación de la especie malanga?



IV. OBJETIVOS

❖ OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la respuesta de multiplicación *in vitro* de yemas de malanga ***Colocasia esculenta*** (L.) Schott. cultivadas en diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA) reguladores de crecimiento.

❖ OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las concentraciones óptimas de Benzilamino purina (BAP) y Acido Indol acético (AIA) que favorece la mejor tasa de multiplicación *in vitro*.
- Determinar el efecto de las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento sobre la longitud de los brotes y la inducción en la formación de raíces.



V. ANTECEDENTES

Diferentes trabajos se han realizado sobre Micropropagación de malanga

Colocasia esculenta (L.) Schott, evaluando diferentes fases en este proceso.

Gómez et al. (1990) cultivaron in vitro malanga (*Colocasia esculenta* var. *antiquorum*), utilizando el medio de cultivo de Murashige y Skoog con la adición de concentraciones de hormonas, siendo 1 mg/l de 6-bencilaminopurina (BAP) más 0.05 mg/l de (AIA) en la etapa de multiplicación, el genotipo de MM8987 fue el de mayor desarrollo, con un promedio de 11,9 brotes por plantas.

Según Saucedo et al. (2007) en la investigación que ellos realizaron se usó la técnica de yemas axilares y ápices caulinares para la experimentación y propagación *in vitro* de la especie de malanga, su principal objetivo fue evaluar cual es la mejor concentración de citoquinina a emplearse en la multiplicación, usaron 3 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ AIA en el tratamiento 3, evaluando el número de brotes y obteniendo un promedio de 1.91 brotes por explantes, estadísticamente (P<0.05).

Los investigadores Reyes y Barahona (2004), usaron las concentraciones del MS + 3 mg L⁻¹ BAP + 1.5 mg L⁻¹ AIA en el T3 y MS + 4 mg L⁻¹ BAP + 2 mg L⁻¹ AIA en el T4. Se utilizó un DCA con cuatro tratamientos y ocho repeticiones, de cuatro frascos por cada repetición con un explante, estos se evaluaron a los 28 días, El



promedio mayor de número de brotes se presentó en el tratamiento 3 con promedios de 1.91 y cuatro con y 2.47 brotes por explantes.

La investigación desarrollada por el equipo de trabajo de García et al. (1999), obtuvieron el mayor número de brotes de Malanga en el tratamiento con una concentración de 3 mg L⁻¹ de BAP en la Micropropagación de dicha especie, pero difiere de los obtenidos por Malachy et al. (1999) quienes obtuvieron los mejores resultados al adicionar al medio de cultivo 4 mg L⁻¹ BAP con explantes de malanga.

El proceso que conlleva la Micropropagación a través de los cultivos de tejidos, se ha convertido en una herramienta de gran ayuda para la producción rápida de plantas de interés económico para el hombre, así como para limpiar de patógenos, especialmente en las que se desarrollan, los de tipo viroide en tejidos vegetales. Por lo antes mencionado este tipo de técnicas o las fases que se llevan a cabo en este tipo de experimentos han comenzado a tomar auge, porque estos evitan la pérdida causada por los patógenos y plagas de las especies vegetales. La familia de las Aráceas es comestible y entre estas se encuentran esas especies cultivadas por sus cormos, raíces y tubérculos de los cuales se desarrollan las raíces del tiquizque blanco y morado (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schoot, *X. violaceum* Schoot, *X. brasiliense* Engl, de la malanga o taro (*Colocasia esculenta* var. *Esculenta* y *C. esculenta* var. *Antiquorum*) y del ñame elefante (*Amorphophallus rivieri* Durieu) (Salazar, 2010).



VI. LITERATURA REVISADA

1. Micropropagación

Sobre este tipo de cultivo de malanga se conoce muy poca información, algunos libros carecen de datos de gran relevancia que caractericen esta especie; de igual manera se desconocen las fases específicas que describan el proceso de la Micropropagación, a continuación se plantearán las literaturas citadas.

La Micropropagación ha sido una gran herramienta para lograr obtener una buena producción en plantas de interés económico, esta es una técnica que ha trascendido con éxito de los ámbitos experimentales a la aplicación técnica (Villalobos y Thorpe, 2010).

En estos tipo de experimento existen algunos términos, siendo de los más comunes la palabra *In vitro* que significa, sencillamente, “en vidrio”, porque durante las primeras etapas del proceso las plantas crecen en tubos de ensayo y matraces. Esta técnica se basa en la “totipotencialidad celular”, esto es, la capacidad de una célula vegetal de formar una planta completa, bajo ciertas condiciones, dadas en el cultivo *in vitro*. Así se logra la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original, a partir de cualquier parte de la planta, ya sea trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas. (Reyes y Hewstone, 1994).

La técnica de Micropropagación consiste en multiplicar rápidamente y regenerar material vegetal para producir una gran cantidad de nuevas plantas genéticamente idénticas, con métodos de laboratorio modernos. (Calderón y



Gonzales, 2009). Esto se da a partir de un fragmento (explante) de una planta seleccionada (llamada planta madre), se obtiene una descendencia uniforme, con plantas genéticamente idénticas, denominadas clones. El explante más usado para los procesos de propagación *in vitro* son las yemas vegetativas de las plantas. Este proceso se compone de ciertas fases que mencionaremos a continuación:

1.1 Preparación de la planta madre

Se debe de realizar una preparación preliminar del cultivo, en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donante de yemas, durante un período que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades.

1.2 Fases del proceso de la Micropropagación

Dentro del proceso de Micropropagación se pueden diferenciar varias fases o etapas:

- a) Desinfección de las yemas de la planta y/o desinfección de semillas
- b) Introducción del material seleccionado *in vitro*
- c) Multiplicación y Regeneración de brotes
- d) Enraizamiento
- e) Aclimatación



a) Desinfección del material vegetal.

Después de seleccionada la planta madre, se procede a extraer los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes, estos pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces o semillas. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. A efectos de obtener tales condiciones, se trabaja en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de cultivo para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluída durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada.

b) Introducción del material *in vitro*.

Luego que se realiza la desinfección, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*.

En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos. Se recomienda coleccionar explantes primarios a campo durante la estación



primaveral, cuando existe una brotación activa de las yemas, ya que el empleo de yemas en estado de dormición ocasiona serios problemas de contaminación.

Para lograr obtener explantes de óptima calidad es conveniente hacer crecer las plantas donantes por un tiempo mínimo en condiciones de invernáculo. De esta forma es posible incidir directamente sobre el estado sanitario y la calidad de los explantes mediante el control de la intensidad lumínica, temperatura y reguladores de crecimiento.

c) Multiplicación y Regeneración de los brotes.

En esta etapa se tiene la perspectiva que los explantes que sobrevivieron las fases anteriores originen brotes (de procedencia axilar o adventicia) con varias hojas. En la base de cada hoja hay una yema que se desarrollará luego de ser puesta en contacto con el medio de cultivo. Periódicamente estos nuevos brotes se deben subcultivar en un nuevo medio mediante divisiones y resiembras en tubos de cultivo u otros recipientes adecuados, estos procesos se realizan en la cámara de flujo laminar o en un lugar aislado que nos permita mantener las condiciones de asepsia, siendo esta una manera de aumentar o multiplicar el número o la división de las plantas. La cantidad de plantas que se obtiene dependerá de la especie vegetal y de las condiciones del medio de cultivo.

El número de plantas que se obtiene por la vía de la Micropropagación permite alcanzar incrementos exponenciales, considerando que todos los factores que afectan el crecimiento hayan sido optimizados. Es importante señalar que en esta etapa, cualquiera que sea la vía de regeneración empleada, es conveniente



evitar la formación de callos. En esta etapa, los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantes.

En las vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica.

La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo.

d) Elección de un medio de enraizamiento de los explantes.

En este proceso de la elección para enraizar los explantes se utilizan principalmente plantas individuales de un tamaño aproximado de 2 cm. Los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación se transfieren a un medio libre de reguladores de crecimiento o que solo contenga hormonas del tipo de las auxinas. Algunas especies de plantas no necesitan pasar por esta etapa y emiten sus raíces en el mismo medio de cultivo donde desarrollan yemas nuevas, por lo tanto el proceso de multiplicación y enraizamiento transcurren en forma simultánea.

e) Aclimatación de los explantes enraizados.



En esta última fase de aclimatación los explantes recién enraizados son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso dependen de la aclimatación. En esta etapa las plantas sufrirán cambios de diferente tipo que permitirán la adaptación de las mismas a vivir en condiciones naturales. En el momento en que se extraen los explantes o plantas enraizados de los frascos, están poco adaptados a crecer en un invernáculo, ya que estos explantes han enraizado y crecido en ambientes con una humedad relativa muy elevada y generalmente tienen estomas (estructuras responsables de regular la transpiración y pérdida de agua en la planta) que no son completamente funcionales frente a descensos de la humedad relativa, y por lo tanto demasiado lentos para evitar la desecación del explante. Por otra parte, crecer en ambientes tan húmedos también suele implicar la falta de una cutícula con cera bien desarrollada, que representa la barrera física para evitar la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de la planta. Los explantes enraizados, deben ser aclimatados a las condiciones de humedad del invernadero disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz, estos se plantarán en las bandejas de siembra cubiertos por un plástico, para mantener la humedad relativa elevada.

La elección de un sustrato con buenas características físicas, es clave para el éxito de esta etapa. Para el trasplante, elegimos un sustrato suelto, poroso, con mezcla de arena turba, cáscara de arroz quemado, para permitir un desarrollo y crecimiento de raíces muy rápido. Las mezclas son diferentes y muy variadas de acuerdo a la especie con la que estamos trabajando. Luego de retirar



cuidadosamente el agar de las raíces para evitar dañarlas, los explantes se enjuagan y se colocan en bandejas con la mezcla de sustratos seleccionada y cubiertos con nylon. Todos los días se debe controlar el nivel de humedad en las bandejas. Si es necesario, se aplica un riego con una pulverizadora manual, para mantener un ambiente húmedo a nivel del sustrato.

A los 15 días del trasplante, se puede comenzar a levantar la cobertura de nylon en las horas de menor calor (temprano en la mañana o en la última hora de la tarde). Al comienzo las plantas se dejan media hora por día destapadas. A la semana siguiente se dejan destapadas durante una hora. Al mes del trasplante, se dejan tapadas durante la noche y si hay crecimiento de nuevas hojas, las plantas pueden permanecer destapadas. Las condiciones del cultivo *in vitro*, generan cambios en algunos aspectos anatómicos y fisiológicos de las plantas, por esta causa, durante la aclimatación, los cambios deben ser muy graduales, para minimizar el estrés y tener mayor tasa de sobrevivencia.

1.3 Medios de Cultivos

La preparación de un medio de cultivo usando como base las sales minerales del medio de Murashige y Skoog (1962) o MS. La característica distintiva de cada medio de cultivo MS es que posee un alto contenido de sales, especialmente las sales de K y de N. También utiliza B, Mn y Zn en cantidades altas. La manipulación de los niveles de auxina y citoquinina va a generar respuesta en cuanto a morfología de los tejidos; y esta podría variar desde la formación de tejido calloso no diferenciado, hasta la formación de raíces, yemas, o embriones.



1.3.1 Las sales minerales:

En este tipo de compuestos principalmente los Macro nutrientes, además de que tienen cada una de ellas un papel determinado en la nutrición del explante, son responsables de la salinidad final del medio, ya que este determinará la mayor o menor capacidad de absorción de los nutrientes en función del tipo de especie que se cultive. (Calderón y Gonzales, 2009)

1.3.2 PH:

El pH del medio debe ajustarse a 5.7 antes de introducirlo a la autoclave a través de las soluciones normales de NaOH, KOH o HCl, pero este desciende durante la esterilización. Este descenso se debe a la composición química y del gelificante, que tiende a disminuirlo.

1.3.3 El gelificante:

El agente solidificante mas usado es el agar en polvo, se dispone para realizar cultivos in vitro de tejidos vegetales. La principal característica que hace del agar un gelificante es su total disolución en agua al ser calentado a 85-100 °C, y su gelificación alrededor de los 35 °C. Es termorreversible, es decir, se puede volver a disolver y a gelificar repetidas veces mediante variaciones en la temperatura, y se puede autoclavar.



1.4 Hormonas reguladoras de crecimiento:

Las hormonas no se caracterizan por generar un efecto específico; es decir, su acción puede derivar en varios efectos diferentes a corto y/o a largo plazo. Entre las cuales se mencionan las más usadas en los experimentos: **Auxinas, Citocininas y Giberelinas**

En algunos casos, la presencia y acción conjunta de dos fitohormonas (como por ejemplo auxinas y citocininas) puede inducir y fijar un tipo determinado de expresión morfogénica de acuerdo a los niveles relativos entre sí, o de cada una de ellas, en un tejido. Así por ejemplo, auxinas y citocininas, de acuerdo a su nivel relativo pueden conducir la formación de brotes, alternativamente de raíces y/o a la proliferación de masas celulares sin mayor organización.

La presencia de hormonas en diferentes niveles en las plantas y sus células, permite que éstas desarrollen caminos morfogénicos alternativos muy distintos, Lo más general es que las células en crecimiento por acción de varias hormonas expresen división y elongación celular; sin embargo, y especialmente bajo condiciones *in vitro*, se ha observado que tales células inician procesos de diferenciación bajo ciertos niveles hormonales (Jordán¹ y Casaretto², 2006).

1.5 Efectos Fisiológicos de las hormonas

Auxinas: El término auxina, proviene del griego “auxein” significa “crecer”, que fue aplicado pocos años después por Kögl y Haagen-Smith al examinar una sustancia promotora de crecimiento vegetal presente en orina humana pero de estructura diferente a la hormona vegetal. La hormona vegetal fue luego aislada



desde maíz y hongos e identificada más tarde como ácido indol-3- acético (Thimann 1977).

El grupo de hormonas de las auxinas, son hormonas vegetales naturales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas. La forma predominante en las plantas es el ácido Indol acético (IAA), muy activo en bioensayos y presente comúnmente en concentraciones nanomolares. Otras formas naturales de auxinas son el ácido 4-cloro-indolacético (4-Cl- IAA), ácido fenilacético (PAA), ácido indol butírico (IBA) y el ácido indol propiónico (IPA). Ya que esta hormona ejerce una acción de dominancia apical, enraizamiento del brote, estimula la elongación celular y de sus frutos, y activa su división de células. (Jordán¹ y Casaretto², 2006).

Citoquininas: Las citocininas son hormonas esenciales en el accionar de varios procesos vinculados al crecimiento, desarrollo de las plantas y relacionados a la acción de varios genes. El reconocimiento que citocininas pudiesen corresponder a hormonas vegetales se inició con el descubrimiento de la kinetina en la época de los 50. El efecto hormonal fue visualizado rápidamente al inducirse, en compañía de auxina, diferentes tipos de morfogénesis en tejidos de tabaco y de otras especies bajo condiciones *in vitro*. Un alto nivel de citocinina vs. auxina provocaba la formación de brotes en tejidos derivados de explantes de médula, mientras que con niveles bajos de citocininas y/o conjuntamente niveles altos de auxina, se observaba la formación de masas celulares no organizadas (callos) y la formación de raíces con gradientes mayores de auxina (Jordan y Casaretto 2006).



Este tipo de hormonas causan una dominancia apical reducida o anulada, pueden iniciar brotes adventicios en porciones de las hojas, venas y pecíolos intactos. Son hormonas vegetales naturales que estimulan un buen desarrollo de la brotación de sus yemas Axilares y adventicias así como también estimula su división celular en tejidos no meristemáticos.

2. Generalidades de la Planta

La malanga *Colocasia esculenta* (L.) Schott, pertenece la familia de las aráceas comestibles,* que comprende los géneros: *Colocasia*, *Xanthosoma*, *Alocasia*, *Cyrtosperma* y *Amorphophallus*. Del género *Colocasia* se derivan numerosas variedades botánicas y cultivares, estas se han dividido en dos grupos o tipos:

- a) Tipo Eddoe, en la que el cormo central es pequeño y los cormelos son grandes.
- b) Tipo Dasheen, el cormo central es grande y los cormelos pequeños.

Es una especie cultivada en áreas muy húmedas, en la zona atlántica; nativa de los trópicos del Viejo Mundo pero en la actualidad esta cultivada en todos los trópicos y a menudo escapa o persiste en áreas abandonadas. Son especies endémicas de los paleotrópicos, solo esta especie es cultivada en todos los trópicos, “Malanga”, “ñame”. (Stevens et al., 2001)

2.1 Morfología de la planta *Colocasia esculenta* (L.) Schott

Esta planta que es familia de las Aráceas, es una especie perenne tropical, que se usa principalmente como vegetal por su cormo comestible, y también



Evaluación de la tasa de multiplicación *in vitro* de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

como verdura. Las flores raramente se usan como ornamentales y en ocasiones es llamada oreja de elefante. Tanto esta especie como las cultivadas del género *Xanthosoma* comparten sustancialmente los mismos usos y algunos nombres, incluyendo mafafa, malanga, callaloo, pituca, chonque, bore, papa china, tetechcamote o cocoñame.

Son plantas herbáceas, sus hojas suculentas que alcanzan una altura de 1-3 metros, sin tallo aéreo. El tallo central es elipsoidal, conocido como cormo y rico en carbohidratos (18-30% en base fresca). La duración del ciclo de crecimiento es de 270 a 330 días; durante los seis primeros meses se desarrollan cormos y hojas. (Ver figura 1)

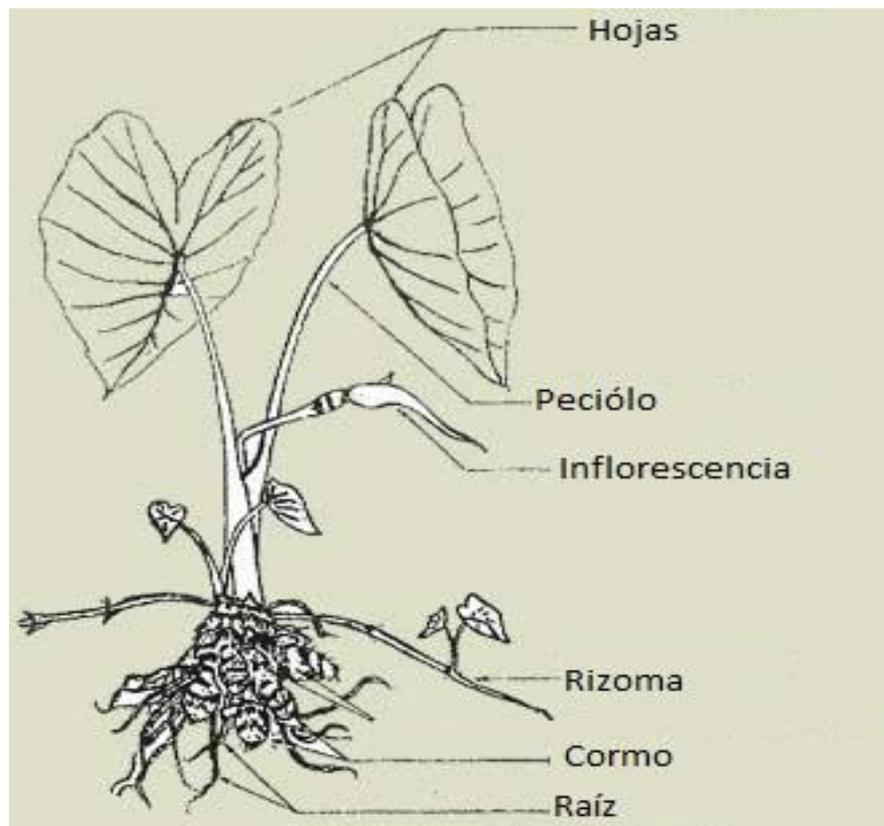


Figura 1. Malanga y sus partes



2.1.1 Cormo

Del cormo central se desarrollan cormelos laterales, el color de la pulpa por lo general es de color blanco, pero también se logran representar clones coloreados en un tono violeta. Son tubérculos subglobosos, subterráneo hasta de casi 6 cm de diámetro o más, frecuentemente con brotes pequeños a lo largo de un costado; hasta de 50 cm de largo. (Stevens et al., 2001).

2.1.2 Hojas

Se producen en el meristemo apical del cormo y aparecen arrolladas por la base formando un pseudotallo corto. Son por general de forma peltada de 0.5-2.5 m de alto, de 32-36 cm de largo y de 22-70 cm de ancho, algunas veces más ancha que larga, parte del centro del haz son de color morado. Las nuevas hojas salen enrolladas de entre las que ya se encuentran formadas y las más viejas se marchitan y secan. Entre el periodo de los primeros seis meses su desarrollo se incrementa rápidamente, luego de esto solo se espera el desarrollo del órgano subterráneo. (Stevens et al., 2001).

2.1.3 Inflorescencias

Dos o más inflorescencias logran emerger, con fragante aroma a frutas, entre los peciolos de las hojas, el pedúnculo de 9-80 cm de largo, posee una espata de 22-43 cm de largo, siendo estas las que se forman en una hoja envolvente que rodea el espádice, siendo un tubo verdoso a veces de color crema con rayas negras, son estructuras características de las aráceas. El ápice es prominentemente angosto



de color verde, posee bayas subglobosas a oblongas; semillas elipsoides de 1mm de largo 0.5 mm de diámetro, café claras. (Stevens et al., 2001)

3. Taxonomía de *Colocasia esculenta* (L.) Schott.

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Liliopsida
Subclase: Arecidae
Orden: Arales
Familia: Araceae
Género: Colocasia
Especie: *Colocasia esculenta* (L.)Schott
(Cronquist, 1988)

4. Cultivo de Malanga en Nicaragua.

La población nicaragüense demanda en su dieta diaria la producción de raíces y tubérculos, la malanga coco es un cultivo cuyo cormos y cormelos son consumidos en diversas maneras por ser rica en carbohidratos, grasas y aminoácidos, además del valor nutricional estos cultivos generan recursos económicos a los productores nicaragüenses principalmente al ser exportados a los mercados de los Estados Unidos, Costa Rica y Puerto Rico.

El cultivo de malanga durante muchos años se manejaba como una planta sin mucha importancia económica usado para el auto consumo familiar o para alimentación de animales en las fincas de los departamentos de la Zona Atlántica y Norte del País. Durante los últimos 6 Años en los Departamentos de Jinotega,



Matagalpa, Atlántico y Frontera con Honduras (Por la Zona de Jalapa - Teotecasinte) han incluido en sus sistemas de producción este cultivo con fines comerciales para abastecer a empresas agro exportadoras. En la actualidad el área de producción de malanga coco (*Colocasia esculenta*) se ha extendido al occidente de nuestro país en el departamento de Chinandega (tonalà).

La importancia de la malanga para Tonalá es que se adapta a suelos que son marginales para plátano, suelos inundados, con problemas de drenaje, y más ahora que se ha visto los problemas causados por los altos vientos, la malanga puede ser una opción de diversificación de ingresos para productores con riego, cuyas plantaciones de plátano están desprotegidas.

Las malangas coco y lila hasta antes del 2004 se cultivaban en menor escala en Jinotega y sin técnica, solo para abastecer el mercado local. El ingeniero Marvin Chavarría, funcionario de Aldea Global en Jinotega, señaló que los productores en Jinotega estaban solo dedicados al cultivo del café, granos básicos, hortalizas a gran escala, productos no tradicionales y ganadería mayor y menor, por lo que había que buscar de cara a los malos precios de estos rubros.

Se inició con la investigación de zonas agroecológicas factibles para la producción del perecedero y en cuatro municipios había factibilidad para la siembra de este rubro. Animados por el resultado de la investigación y la experiencia que ya traían, se procedió a la formulación del proyecto de la planta de procesamiento de raíces y tubérculos, la que se logró construir tres años después gracias a los organismos involucrados.



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de Colocasia esculenta (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

La planta inició operaciones en Jinotega en un mal momento: debido a la drástica caída de los precios internacionales, pues antes los mercados estadounidense y puertorriqueño pagaban 14 dólares por quintal y ahora solo siete dólares. Se pensó que sería algo temporal y que pronto pasará, instando a los productores esforzados de Jinotega a continuar con estas alternativas de cultivos a seguir sembrando y tener paciencia como cuando los precios del café están deprimidos.

Se Implementan programas de Buenas Prácticas de Manufactura. Y esto, está dirigido a unos 4000 pequeños productores de raíces y tubérculos que necesitan mejorar la calidad de su producción en la Región Autónoma del Atlántico Sur.

Mejorar la calidad y rendimiento de su producción mediante la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura, BPM y la certificación de sus plantas procesadoras es la aspiración de los productores de raíces y tubérculos de Nueva Guinea, Región Autónoma Atlántico Sur, RAAS.

Datos de la Asociación de Productores y Exportadores de Nicaragua, Apen, indican que en la RAAS existen unos 4000 pequeños productores de raíces y tubérculos que necesitan mejorar la calidad de su producción. Hemos brindado asistencia técnica a más de 500 productores, además hemos preparado a seis plantas procesadoras para que obtengan su certificación de Buenas Prácticas de Manufactura, BPM y en Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control. La capacitación de los productores en BPM y Haccp contó con el



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de Colocasia esculenta (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

financiamiento del Gobierno de Finlandia por 21 500 euros, ejecutados a través del Proyecto de Fortalecimiento de la Pequeña Empresa de Nicaragua, y Desarrollo de las Cadenas de Valor, Propemce, ejecutado por Apen.

Nueva Guinea es el principal productor de raíces y tubérculos de Nicaragua y según datos del Ministerio Agropecuario y Forestal, Magfor, el municipio concentra el 70 por ciento del área cultivada del país, equivalente a 12 mil manzanas.

Las ventas externas de productos como malanga y quequisque se han incrementado considerablemente en los últimos años, hasta septiembre de 2012 los ingresos generados por sus exportaciones ya sumaban 6.4 millones de dólares, frente a 4.6 millones del mismo período de 2011.

5. Pruebas Estadísticas.

Los diseños experimentales hoy en día se realizan en todos los campos de estudio, sirviendo esto como una prueba de dicho ensayo. Este aprendizaje se da a través de una serie de actividades en donde se unen en un solo proceso, se realizan experimentos para lograr generar datos a partir de dicho proceso y obtenemos la información del experimento donde establecemos nuevos resultados que conllevan a desarrollar nuevos experimentos y así sucesivamente. Un factor determinante al momento de usar este tipo de pruebas estadísticas, es que para poder llegar a obtener resultados satisfactorios, se recomienda que entre más grande se la muestra a trabajar, los resultados llegaran a ser más significativos.



5.1 Prueba de Comparación Múltiple de Dunnett

Este tipo de prueba es realmente útil, son usadas cuando el investigador tiene el interés de determinar si hay alguna diferencia del testigo con alguno de los tratamientos en si se realiza una comparación del testigo con cada uno de los tratamientos a evaluarse.

5.2 Prueba de Duncan

La Prueba del Rango múltiple Duncan es otra prueba para determinar la diferencia entre pares de medias después que se ha rechazado la hipótesis nula en el análisis de varianza.



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo experimental se realizó de septiembre 2011 a septiembre 2012, llevándose a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejido vegetal del departamento de Biología UNAN-León en el Jardín Botánico Ambiental “El Ojoche”, ubicado a 600m al oeste de la Universidad Tecnológica La Sallé.

El trabajo se realizó con la especie de *Colocasia esculenta* (L.)Schott, Malanga. Esta planta pertenece a la familia de las Aráceas. El material con el que se desarrollo dicha investigación fue proporcionado por el Laboratorio de Cultivo de Tejido de la UNAN-León.

Se inició con la preparación del material de siembra durante algunos meses, esto se realizó con el interés de obtener un mayor número de explantes, se hicieron los subcultivos hasta lograr obtener el material necesario para iniciar el experimento, así como también, tuvieron un desarrollo equitativo. (Ver figura 2). Esto se hizo con medio de cultivo MS libre de hormonas.



Figura 2. Transferencia de malanga en cámara de flujo laminar.



Se establecieron las diferentes concentraciones de hormonas; se escogió el de Murashige y Skoog (1962) (MS) ya que es el más utilizado en los laboratorios de Cultivo de Tejido; luego de analizarse otros trabajos realizados con el mismo objetivo. Las hormonas que se usaron en este experimento fueron la citoquinina Benzilamino-purina (BAP), ya que esta es ampliamente usada en muchas investigaciones, porque estimulan la formación de yemas múltiples, da una mayor proliferación así como la elongación de sus brotes axilares y la otra hormona fue una auxina Ácido Indol acético (AIA) ya que este tipo de hormonas estimula la elongación celular y activa su división de células. (Ver cuadro 1).

Reguladores de Crecimiento		
Tratamientos	BAP mg/l	AIA mg/l
T1	0	0
T2	0.5	0.025
T3	1	0.05
T4	1.5	0.075
T5	2	0.1
T6	0.5	0.25
T7	1	0.5
T8	1.5	0.75
T9	2	1

Cuadro 1. Concentraciones de las hormonas reguladoras de crecimiento utilizadas en el experimento.



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

Se procedió a realizar los medios de cada tratamiento, con cada una de las concentraciones de las hormonas reguladoras de crecimiento; se ajusto el pH a 5.7 adicionándole el gel rite. Luego de la preparación de los medios (ver figura 3) se procedió a verter el líquido en los frascos



Figura 3. Preparación de los medios

correspondientes donde se haría la siembra. Los medios fueron esterilizados en la autoclave a 120°C por 20 minutos. (Ver figura 4).



Figura 4. Cuarto de autoclave para material del laboratorio.

Se llevo a cabo la selección del material con el que se trabajaría, para el ensayo se emplearon brotes cuyo tamaño fue de 1.5 cm, el método consistió en 9 tratamientos para este experimento, cada frasco constó de 5 explantes, de los cuales el testigo contenía el medio Murashige y Skoog (MS) (1962) sin hormonas y al resto de los tratamientos el medio MS (1962) con la adición de las hormonas de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA) a distintas concentraciones. El subcultivo se realizó en la cámara de flujo laminar para realizar la disección del material y lograr evitar la contaminación, de manera que los explantes obtuvieran la mejor homogeneidad y rasgos fisiológicos entre ellos, así como también el nivel



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

nutricional, un grado de desarrollo adecuado que se observe, la temperatura y el nivel de luz constante. Luego estos son colocados en el cuarto de crecimiento a 25 ± 1 °C y con un fotoperíodo de 8 y 16 horas de luz. (Ver figura 5)



Figura 5. Incubación de los explantes de malanga en el cuarto de crecimiento.

Realizada la siembra se esperaba que el desarrollo de los explantes fuera la multiplicación de los brotes, ya que ese es el objetivo principal que se planteó en este trabajo. Periódicamente se realizaron observaciones a cada uno de los frascos de siembra, descartando cualquier material ya fuera que este estuviera contaminado o muerto.

Se esperó que en el transcurso del avance de la siembra, dichos explantes se logaran desarrollar de una manera diferenciada y no en grumos, como pueden



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

sucedan algunas veces, ya que esto no le permite una buena diferenciación. (Ver figura 6)



Figura 6. Desarrollo en elongación de explantes, luego de 2 semanas de su siembra

Las observaciones y la toma de datos de cada uno de los frascos, se evaluaron a los 30 y a los 60 días. Las variables de interés a evaluarse en este experimento fueron el número de brotes (tasa de proliferación), longitud de brotes y si hubo formación de raíces en cada uno de los tratamientos. Los cuales se analizaron mediante el paquete estadístico de SPSS 15, la comparación de las medianas, las pruebas de Duncan y prueba de comparación Múltiple de Dunnett.



VIII. RESULTADOS Y DISCUSION

Con los datos obtenidos en relación a los parámetros establecidos en nuestros objetivos, como son la tasa de proliferación, longitud de brotes y la formación de raíces a través de los 9 tratamientos a diferentes concentraciones de hormonas, se logran observar diferentes significancias.

De acuerdo a los análisis realizados en la prueba de comparación múltiple de Dunnett entre el testigo y los tratamientos nos refleja (**ver cuadro 2**), que no existe diferencia significativa a los 30 días, la evaluación fue a un margen del 5%.

Comparaciones Múltiples (b)							
Variable Dependiente: Número de Brotes							
	(I) Tratamientos	(J) Testigo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Significancia	95% Intervalo de confianza	
						Límite superior	Límite inferior
Dunnett t t (2-sided)(a)	2	1	,125	5,942	1,000	-16,09	16,34
	3	1	4,125	5,942	,982	-12,09	20,34
	4	1	-1,000	5,942	1,000	-17,21	15,21
	5	1	-9,125	5,942	,520	-25,34	7,09
	6	1	-,625	5,942	1,000	-16,84	15,59
	7	1	-6,250	5,942	,856	-22,46	9,96
	8	1	-11,250	5,942	,297	-27,46	4,96
	9	1	-11,375	5,942	,286	-27,59	4,84
a Dunnett has control group ...							
b Días = 30							

Cuadro 2. Comparación múltiple de Dunnett entre tratamientos.

Caso contrario ocurrió (**ver cuadro 3**) en la evaluación a los 60 días, porque se logró determinar que si existe diferencia de significancia al mismo nivel de margen del 5%, pero sólo se logró observar en el T9, del cual se obtuvo una única diferencia significativa donde el valor $P=0.044$ fue el de menor nivel, por lo que el



valor de significancia es a un nivel de $P=0.050$.

Comparaciones Múltiples (b)							
Variable Dependiente: Número de Brotes							
	(I) Tratamientos	(J) Testigo	Diferencia de medias(I-J)	Error Estándar	Significancia	95% Intervalo de confianza	
						Límite superior	Límite inferior
Dunnett t (2-sided)(a)	2	1	-2,000	6,825	1,000	-20,62	16,62
	3	1	-,750	6,825	1,000	-19,37	17,87
	4	1	-2,500	6,825	1,000	-21,12	16,12
	5	1	-5,750	6,825	,949	-24,37	12,87
	6	1	-7,125	6,825	,861	-25,75	11,50
	7	1	-12,875	6,825	,301	-31,50	5,75
	8	1	-12,875	6,825	,301	-31,50	5,75
	9	1	-19,000(*)	6,825	,044	-37,62	-3,38
* The mean difference is significant at the .050 level.							
a Dunnett has control group ...							
b Días = 60							

Cuadro 3. Análisis de la Prueba de comparación múltiple de Dunnett entre los tratamientos.

En la prueba de comparación se obtuvo una única diferencia significativa en donde el ($P= 0.044$)

A través de la **Prueba de Duncan** que se realizaron, tanto a nivel de los 30 días como de los 60 días (**Ver cuadro 4**). Los datos sombreados nos lograron reflejar que a través de los análisis de los 2 subconjuntos homogéneos en los que estos se dividen al 5% de significancia que se formaron, que en la evaluación de 30 días la diferencia existe con los T8 y T9 ya que estos son los de menor promedio y el único tratamiento con un mayor promedio es el T3. Los datos sombreados nos reflejan que los resultados de la evaluación a los 60 días dio una diferencia aun más



significativa (**Ver cuadro 5**), ya que el tratamiento con el de menor promedio es el T9 y los que obtuvieron un mayor promedio son los T1-T3-T2 y T4. Siendo estos **Grupos Homogéneos según Prueba de Duncan.**

Cuadro 4: Número de Brotes Días = 30					Cuadro 5: Número de Brotes Días = 60				
	Tratamientos	N	Subset for alpha = .05			Tratamientos	N	Subset for alpha = .05	
			2	1				2	1
Duncan(a)	9	8	11,25		Duncan(b)	9	8	6,63	
	8	8	11,38			7	8	12,75	12,75
	5	8	13,50	13,50		8	8	12,75	12,75
	7	8	16,38	16,38		6	8	18,50	18,50
	4	8	21,63	21,63		5	8	19,88	19,88
	6	8	22,00	22,00		4	8		23,13
	1	8	22,63	22,63		2	8		23,63
	2	8	22,75	22,75		3	8		24,88
	3	8		26,75		1	8		25,63
	Significancia			,103		,057	Significancia		
Means are displayed ...					Means are displayed ...				
Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000					Uses Harmonic Mean Sample Size = 8,000				

Cuadro 4-5. Grupos Homogéneos según Prueba de Duncan

En los análisis de la Prueba de Duncan, se realizó una comparación de la longitud de brotes de cada tratamiento con el testigo, (**ver cuadro 6**) todos resultaron ser distintos del control con el 5% de significancia. Se logra observar que se forman 5 subgrupos homogéneos.



	Tratamientos	N	Subconjuntos				
			1	2	3	4	5
Duncan(a,b)	9	16	,9863				
	8	16	1,2175	1,2175			
	7	16	1,4113	1,4113			
	6	16	1,6538	1,6538	1,6538		
	4	16		1,8163	1,8163		
	3	16			2,2300	2,2300	
	2	16			2,4088	2,4088	
	5	16				2,9438	
	1	16					5,1888
	Significancia			,096	,137	,059	,065
Means are displayed2 III 1,057 ...							
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 16,000.							
b Alpha = ,050.							

Cuadro 6: Prueba de Duncan sobre las longitudes de medias.

Los valores que se obtuvieron determinaron que el T3 tuvo la mayor tasa de proliferación con 5.35 y su promedio de longitud de brotes fue de 2.56 cm a los 30 días y a los 60 días el Testigo sin hormonas fue el que obtuvo un promedio de tasa de proliferación 4.52 y su promedio de longitud de brotes 5.49 cm.

A pesar de que en el medio Testigo se logra representar un mayor promedio de longitud de brotes en los 60 días de sus siembras, se demuestra que el T3 que correspondía a los 30 días de la evaluación, es el tiempo óptimo para trabajar en la multiplicación de esta especie y lograr obtener una alta tasa de proliferación.

Se logra evidenciar la efectividad de la hormona BAP en nuestros resultados, puesto que hubo estimulación dando buen desarrollo, ya que esta hormona ha sido



hasta el momento, la citoquinina más empleada y de mayor efectividad para la Micropropagación de varias especies tanto vegetales como frutales.

Se logró comprobar gracias a Ocampo y Núñez (2007), que de acuerdo a los resultados obtenidos en su experimento usando una baja concentración de 0.25mg/l de la hormona citoquinina BAP, los datos obtenidos indicaron que fue la mejor respuesta en la inducción de brotes, pero sus resultados difieren de los que obtuvimos, ya que el T3 con 1mg/l de BAP fue el que presentó la mejor respuesta en el desarrollo de brotes, estos se asemejan sólo en el tiempo de evaluación donde ambos fueron de 30 días.

A través de los resultados sobre la tasa de proliferación así como el promedio de longitud de brotes, se logra observar diferencias de valores, esto en comparación al experimento de Reyes y Barahona (2004), en donde la etapa de multiplicación tuvo un promedio de 1.91 cuando utilizó en el T3 un medio MS + 3mg/l BAP + 1.5mg/l AIA y el T4 MS + 4mg/l BAP + 2 mg/l AIA con un promedio de 2.47; esto nos demostró que el T3 MS + 1mg/l de BAP + 0.05mg/l de AIA, obteniendo un promedio de 5.35 esto refleja que fueron mayores en comparación con los que obtuvieron Reyes y Barahona.

También de igual manera, Rodríguez et al. (2003) contribuye con su investigación, ya que usó el medio suplementado con BAP, igual al que usamos en nuestro estudio y destaca en sus conclusiones que el mejor medio para el establecimiento del cultivo de ápices de malanga en las condiciones experimentales descritas fue el medio MS suplementado con BAP 1 mg/L obteniendo un índice de



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

multiplicación con una media de 3.8, teniendo una gran igualdad con nuestra investigación, puesto que la concentración que se usó en el T3 de nuestro experimento fue igual de 1mg/l de BAP, del cual obtuvimos el mayor promedio en su etapa de multiplicación con una media de 5.35.



Figura 7. Formación de raíces

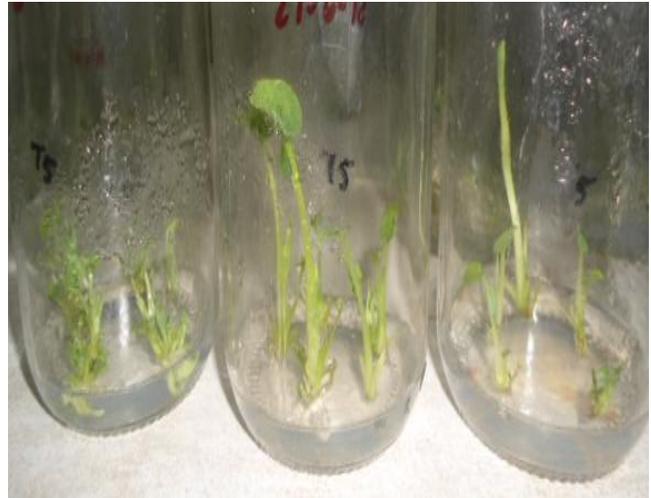


Figura 8. Brotes proliferados sin formación de raíces

Las hormonas tuvieron efectos distintos en cada uno de los tratamientos, en la evaluación de la formación de raíces, estas se logran observar solo en el testigo (ver figura 7), del cual su composición era el medio MS (1962). A medida que en el resto de los tratamientos estaba la presencia de las hormonas tanto de las auxinas como de la citoquininas, (ver en la figura 8) no se logro ver un desarrollo de dichas raíces.

Al transcurrir 2 semanas después de la siembra, se observó que los explantes



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

estaban dando respuestas, con respecto a la estimulación de un buen desarrollo, así como una buena diferenciación entre cada brote. En la figura 9 se observa el crecimiento de los brotes en los diferentes tratamientos.

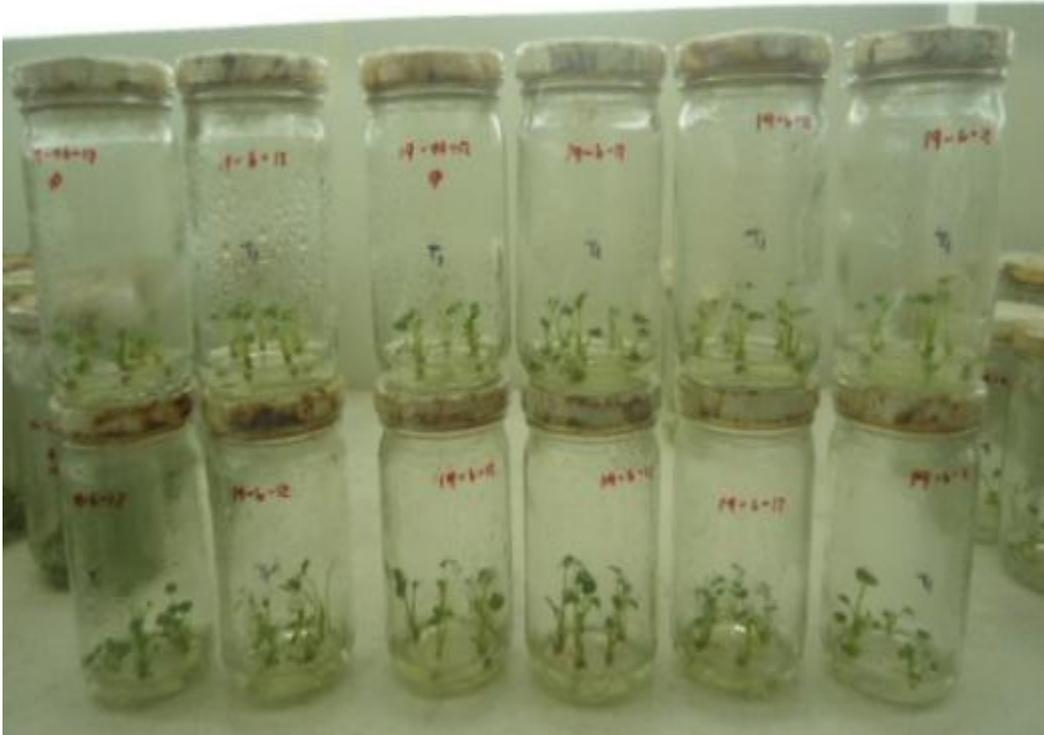


Figura 9. Respuesta proliferativa de los brotes cultivados en los diferentes tratamientos

En los resultados que se obtuvieron en lo que respecta a la proliferación de la especie de malanga, el T3 fue el que obtuvo la mejor respuesta pero esto tanto a la en la evaluación de 30 como de 60 días, cabe señalar que el estudio de Cárcamo 2004 coincide en que esta respuesta es debido a la concentración de la hormona de BAP 1mg/l, obteniendo el más bajo porcentaje de explantes muertos en un índice de 25 días, pudiendo observarse una buena brotación así como un buen desarrollo de hojas.



Estos mismos análisis nos reflejan que en los T7-T8 y T9, se logra observar un descenso a medida que la concentración de las hormonas iba aumentando desde un nivel de: 1mg/l BAP- 0.5mg/l AIA, 1.5mg/l BAP- 0.75mg/l AIA y 2mg/l BAP-1mg/l AIA produciendo un efecto inhibitorio en ellas, siendo estos los resultados reflejados en ambos niveles de evaluación de los 30 y 60 días.

A medida que las concentraciones de las hormonas iba en aumento se observó un agotamiento de los nutrientes y esto se manifestó con la inhibición del desarrollo de los explantes, el marchitamiento y la muerte

Del T1 (Testigo) se consideró, que éste podría usarse como un medio óptimo que sirva para la regeneración de la especie malanga, debido a los resultados de sobrevivencia que obtuvimos, porque además de haber tenido un buen desarrollo en elongación se observó la formación de raíces y plantas vigorosas.

En base a los resultados obtenidos la hipótesis Ho se acepta ya que esta nos indicaba que no existía diferencia significativa en la tasa de proliferación según el balance de hormonas reguladoras de crecimiento.



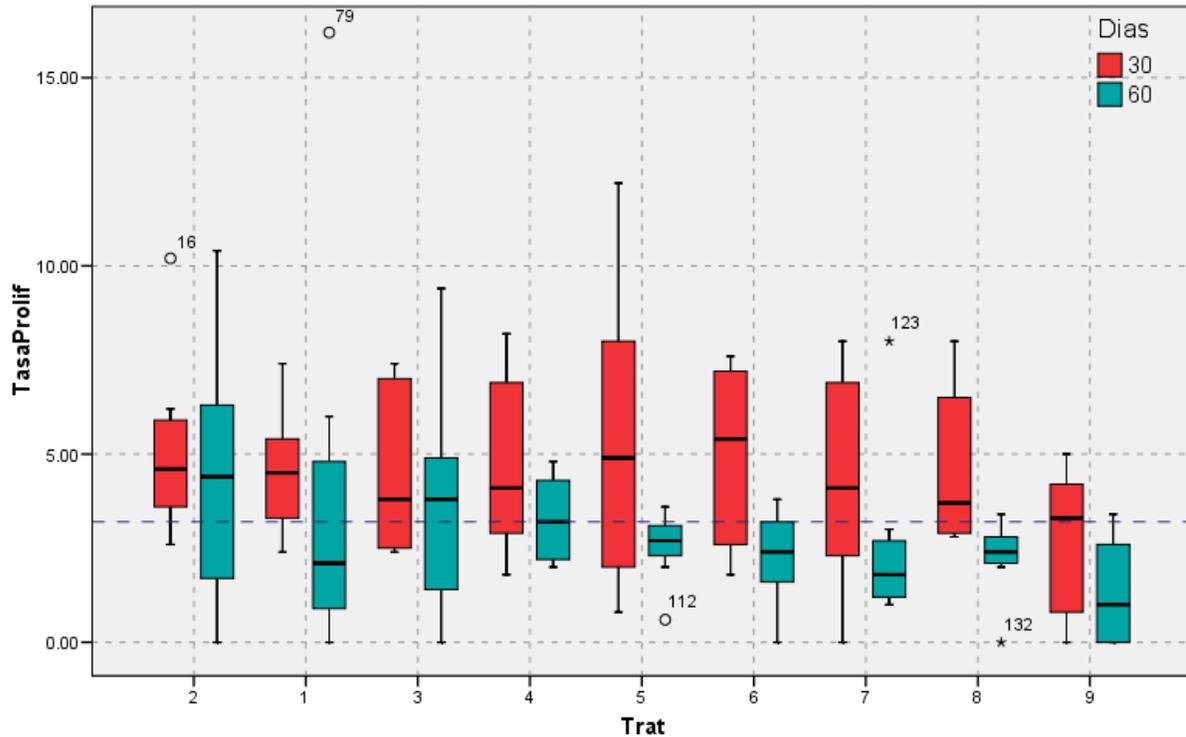
Variable Dependiente: Tasa de Proliferación

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media de cuadrados	Estadísticos de Prueba F	Significación
Longitud	17,919	1	17,919	2,774	,098
Días	97,376	1	97,376	15,074	,000
Tratamiento	92,279	8	11,535	1,786	,086
Días * Tratamiento	21,382	8	2,673	,414	,911
Error	807,491	125	6,460		
Total	1019,200	143			

Cuadro 7. Análisis de varianza entre los tratamientos

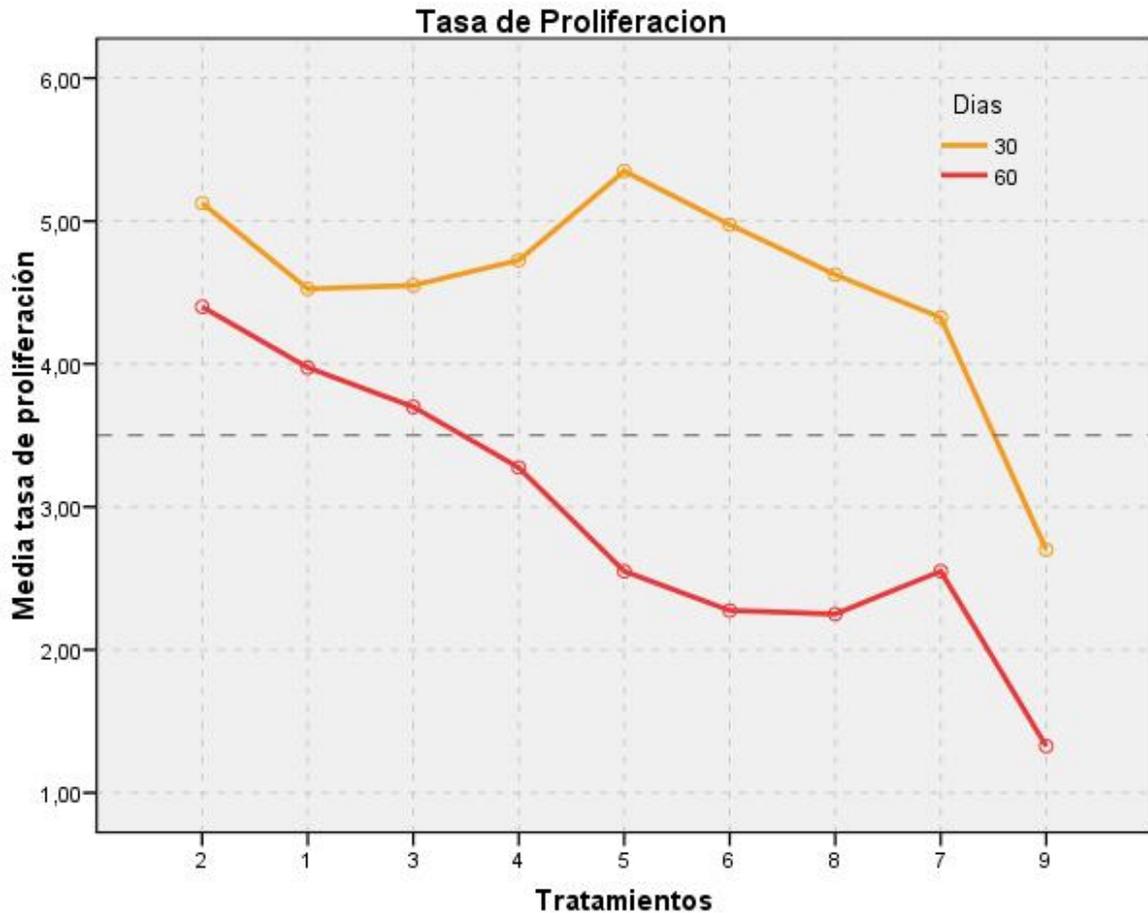
Y la hipótesis H_0 se rechaza ya que se logra observar que los tratamientos no tienen diferentes efectos sobre la multiplicación del número de brotes de cada frasco, es decir que no existe diferencia sobre el balance de hormonas con respecto a la tasa de proliferación.

A través del diagrama comparativo de días y tratamientos (**gráfica 1**) se analiza la mediana y también la variabilidad de la tasa de proliferación y se observa que hay diferencia significativa entre los días obteniendo una mayor tasa los T2, T1, T3, T4, T5, T6, T7 y T8, estando el T9 sobre el límite de la mediana general esto a los 30 días y en la segunda evaluación a los 60 días el T2 y T3 están sobre el límite de la mediana y el resto de los tratamientos por debajo de esta. Estos se logran diferenciar por sus colores, con algunos datos atípicos que se logran observar en el diagrama.



Grafica 1: Diagrama de cajas comparativo por días y tratamientos.

En el diagrama de perfil (**gráfica 2**) se compara la posición central a través de las medias, en donde se puede observar que por encima de este nivel se encuentran los tratamientos más representativos como son: T2-T1-T3-T4-T5-T6-T8 y T7 se encuentran sobre el nivel de la media y por debajo de este observamos sólo elT9. En la evaluación a los 60 días tenemos los T2- T1 y T3 estos poseen un valor de media más bajo pero están sobre el nivel y por debajo de este se logran ver los T4-T5- T6- T8- T7 y T9.



Grafica 2. Comparación de Medias a través del Análisis de la tasa de proliferación para cada tratamiento según días.

En el **gráfico 3**, se logra representar a nivel de la media, que la tasa de proliferación de los T3-T1-T2-T4 y T6 está por encima de este siendo los más efectivos a los 30 días y los tratamientos que tuvieron menos efecto fueron los T5-T7-T8 y T9 estando por debajo del nivel.

A los 60 días de la evaluación se observa cierta similitud por los tratamientos que están por encima del nivel de la media siendo estos T3-T1-T2-T4 y T5, los que



están por debajo de la media son los T6-T7-T8 y T9 siendo estos los de menor tasa de proliferación.

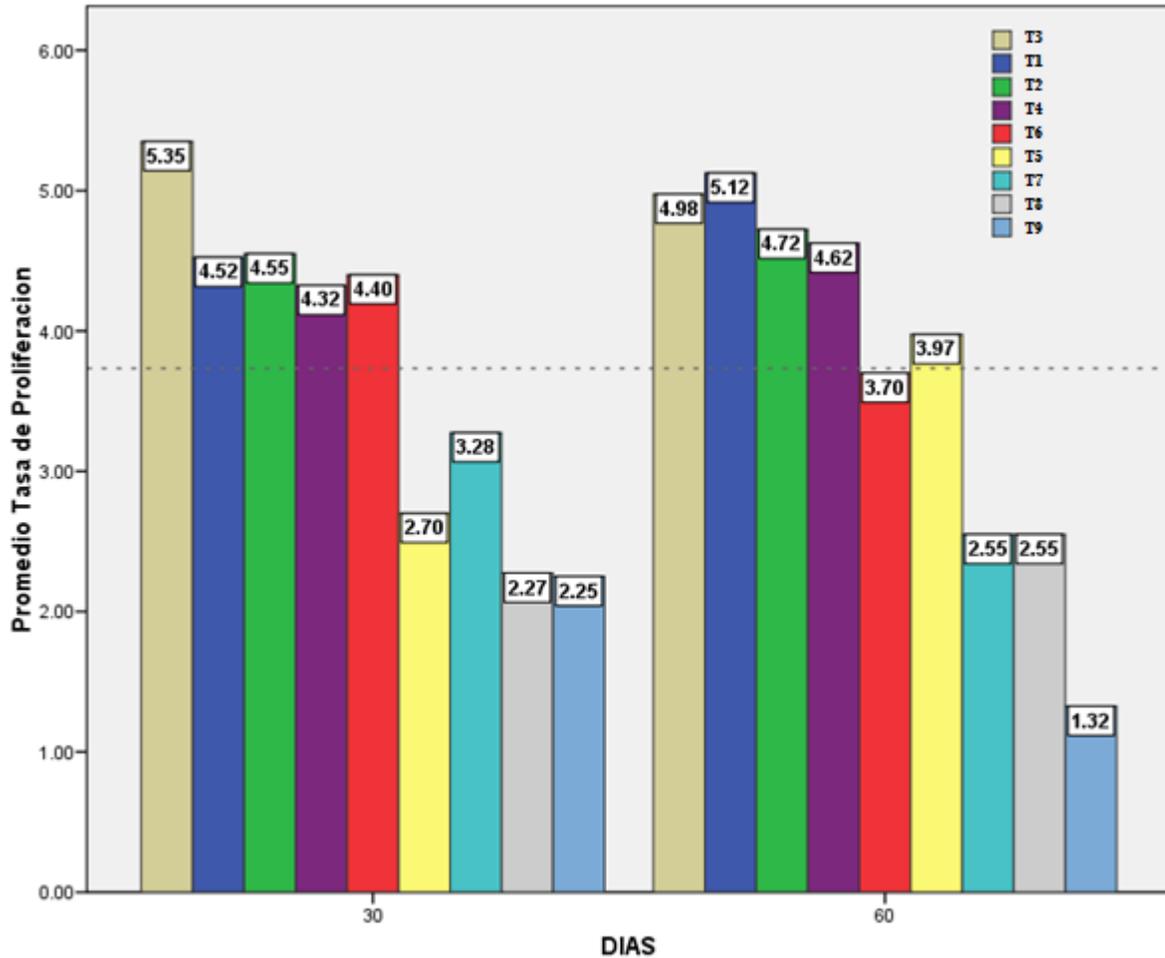


Gráfico 3. Diagrama de la tasa de proliferación.

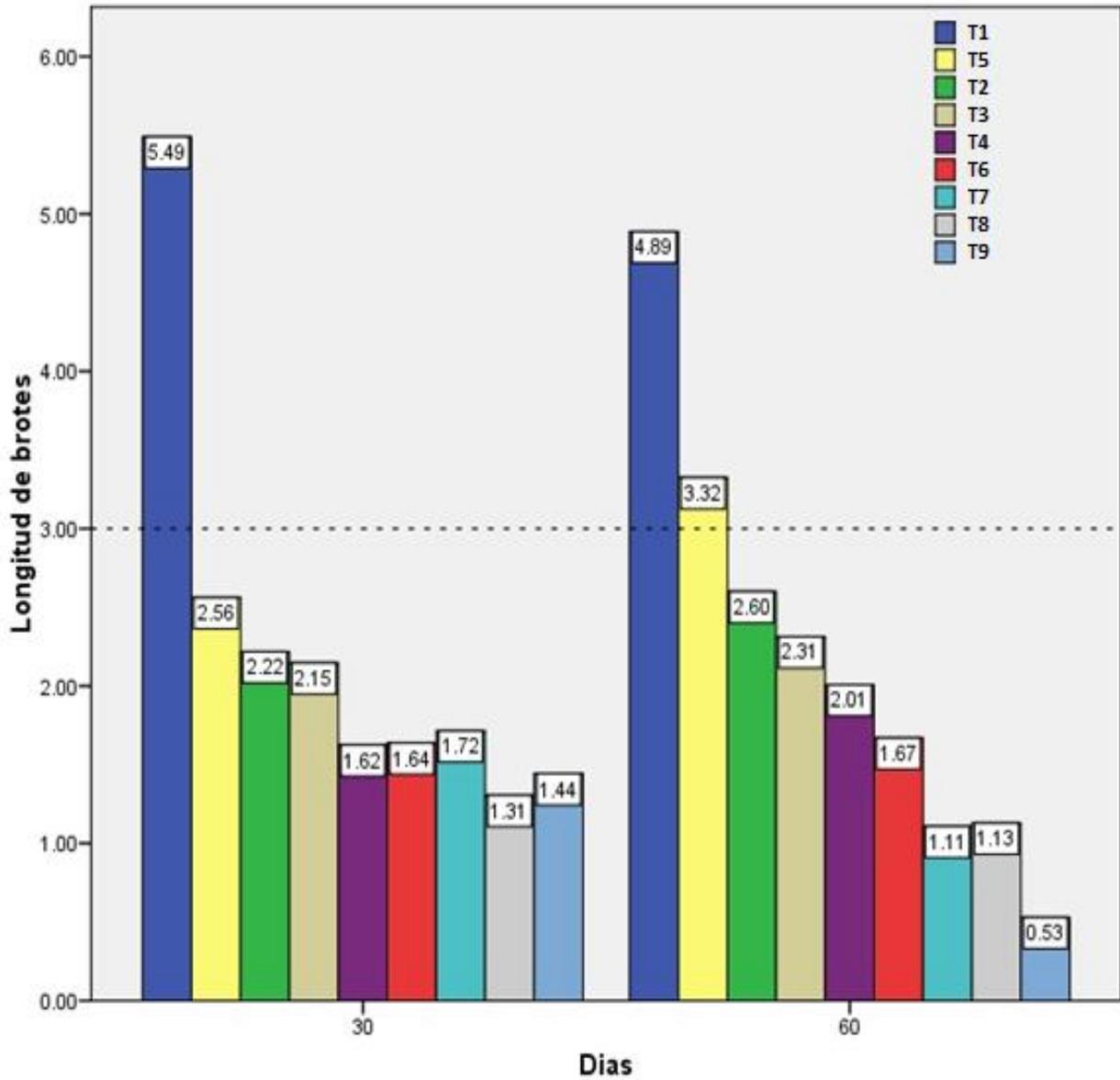
A través de la **gráfica 4**, se logra determinar que el mejor tratamiento con respecto al promedio de longitud de brotes es el T1 (Testigo) tanto a los 30 días con un promedio de 5.49 longitud de brotes.

En la siembra a los 60 días se obtuvo un promedio con 4.89 en el T1 (Testigo), el cual sólo constó con medio MS (1962) sin hormonas. Pero se logra



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de Colocasia esculenta (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

observar que a los T5-T2-T3-T4 y T6 se encuentran por encima de los niveles de la primera evaluación y que luego los valores del T7-T8 y T9 bajan.



Grafica 4. Comparación de longitud de brotes en cm.



IX. CONCLUSIONES

A través de los resultados obtenidos en el laboratorio Cultivo de Tejido en base a la evaluación de la multiplicación de Malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott.), así como la longitud en cm y la formación de raíces, en el cual se usaron diferentes concentraciones de hormonas reguladoras de crecimiento como son Bencilaminopurina (BAP) y Acido indolacético (AIA); se logro evaluar lo siguiente gracias a los análisis estadísticos realizados:

1. Con los análisis realizados a través de la prueba de comparación múltiple de Dunnett se determinó que en la evaluación de los 30 días no existe diferencia significativa.
2. El tratamiento que tuvo el mayor índice de tasa de proliferación fue el T3 (1mg/l de BAP + 0.05mg/l de AIA) con 5.35 en promedio y sobre la evaluación de longitud en cm fue de 5.49 a los 30 días.
3. En la evaluación a los 60 días el de mayor índice de tasa de proliferación fue el testigo I solo con (MS) que obtuvo promedio de 5.12 y de longitud en cm fue de 4.89.
4. De los 9 tratamientos, el testigo I fue el de mejor desarrollo de las raíces, sin obtener ninguna respuesta en los demás tratamientos. Se determinó que las diferentes hormonas que se usaron, actuaron como inhibidores de las raíces.



X. RECOMENDACIONES

Por los resultados obtenidos se recomienda que para lograr obtener una buena tasa de proliferación de la especie de malanga y longitud en cm de (*Colocasia esculenta* L. Schott.):

1. Se pueden continuar estudios empleando concentraciones menores a las utilizadas en este ensayo.
2. Evaluar la tasa de proliferación y elongación en periodo de 30 a 45 días. Ya que gracias a las literaturas citadas se considera que serian un periodo optimo para obtener una buena multiplicación de la especie a trabajar.
3. Llevar a cabo en la fase de aclimatación el material de este ensayo.



XI. BIBLIOGRAFIA

Cronquist, A. (1988). The evolution and classification of flowering plants. New York 10458, USA. Editorial, The New York Botanical Garden Bronx.

Calderón, P. y Gonzales, H. (2009). Micropropagación y Aplicación de Termoterapia a material de siembra de Yuca (*Manihot esculenta Crantz*), en el laboratorio Cultivo de Tejido. Tesis de Licenciatura no publicada, UNAN, León, Nicaragua.

García, M., Mederos, V., Rodríguez, S., López, J., Ventura, J., Cabrera, M., Hernández, R., González, J. E., Bermúdez, D., Gálvez, D., Gutiérrez, V. y Gálvez, J. R. (1999). Generalización de la metodología para la Micropropagación de la malanga (*Xanthosoma spp.*) en Cuba.

Recuperado de:

<http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/27954/38325>

Gómez, L., Saborio, F., Salazar, I., Arias, O., Thorpe, T. (1990). Establecimiento y multiplicación in vitro de cuatro genotipos de ÑAMPI (*Colocasia esculenta*). Laboratorio de Tejido de Cultivo.

Recuperado de:

http://www.mag.go.cr/rev_agr/v15n1-2_123.pdf

Jordán, M., Casaretto, J. (2006). Capítulo XV Hormonas y Reguladores de crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas.

Recuperado de:

<http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>

Jordán¹, M., y Casaretto², J. (2006). Capítulo XVI- Hormonas y Reguladores de crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas.



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

Recuperado de:

<http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/Auxinasgiberelinasycitocininas.pdf>

López, M., Vázquez, E. y López, R. (1995). Raíces y tubérculos.

Recuperado de:

<http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v13n2/v13n2a09.pdf>

Larios, S., Mendoza, P. (1986). Cultivo in vitro en hojas inmaduras de *Sacharum officinarum*.

Tesis de Licenciatura no publicada, UNAN, León, Nicaragua.

Malachy, D., Pérez, J., Agramonte, D., Jiménez, F., Ramirez, D., Gutiérrez, O. y Pérez, M.

(1999). Tecnología para la micropropagación in vitro de clones de *Xanthosoma sagittifolium* (L). Santa Clara – Cuba Instituto de Biotecnología de las plantas.

Ediciones GEO.

Montgomery, D. C. *Diseño de y Análisis de Experimentos*. Arizona State University, Grupo

editorial Iberoamérica, Nebraska 199.Col. Napales 03810, México, DF.

Navarro, W., Perea, M. (1996). Técnicas in vitro para la producción y Mejoramiento de

plantas. EUNA, Heredia, Costa Rica.

Ocampo, Fabiola, Núñez, Victor Manuel. (2007). Propagación in vitro de *Psidium guajaba*

mediante organogénesis directa a partir de segmentos nodales.

Recuperado de:

<http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Revista/3.PropagacininvitrodePsidiumguajaba.pdf>

Orellana, P. (1998). Instituto de biotecnología de las plantas.

Recuperado de:

http://revista.ibp.co.cu/component/docman/doc_view/1508-bv0397-12-12103-24.html



Quiroz, N. y Mendoza, K. (2001). Micropropagación de Orquídeas *Epidendrum* sp. desarrollado en el laboratorio de cultivo de tejido. Tesis de Licenciatura no publicada. UNAN, León, Nicaragua.

Recuperado de: <http://es.wikipedia.org/wiki/Micropropagaci%C3%B3n>

Reyes, H y Hewstone, N. (1994). Cultura de tejidos en la agricultura.

Recuperado de:

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/3235/1/T-ESPE-031080.pdf>

Reyes, X., Barahona, J. (2004). Efecto de reguladores de crecimiento en las diferentes fases de la propagación in vitro de la malanga *Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott.

Recuperado de:

http://www.uteq.edu.ec/eventos/2007/congreso_bioteecnologia/bioteecnologia/archivos/203.pdf

Saucedo, S.G., Ramos, L.E., Reye, X. (2007). Efecto de los Reguladores de Crecimiento para la Propagación in vitro de la Malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott).

Recuperado de:

http://www.uteq.edu.ec/revista_cyt/archivos/2008/v1/articulo_4.pdf

Salazar, S. (2010). Micropropagación de Aráceas comestibles.

Recuperado de:

<http://ediciones.inca.edu.cu/files/congresos/2010/CDMemorias/memorias/ponencias/talleres/BTV/ra/BTV-P.14.pdf>

Stevens, WD., Ulloa, C., Pool, A., Montiel, O. (2001). *Flora de Nicaragua, Introduccion Gimnospermas y Angiospermas*. St. Luis Missouri, USA, Missouri Botanical Garden Press.



Evaluación de la tasa de multiplicación in vitro de *Colocasia esculenta* (L.) Schott. mediante la aplicación de diferentes concentraciones de Benzilamino-purina (BAP) y Ácido Indol acético (AIA).

Taracena, E. (2004). La Malanga (*Colocasia esculenta*) Agricultura.

Recuperado de:

http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2086.pdf

THIMANN, KV. (1977). Hormone action in the whole life of plants. Amherst: University of Massachusetts Press.

Recuperado de:

<http://books.google.com.ni/books?id=n6RiTbhbUOcC&pg=PR3&lpq=PR3&dq=1977.+Hormone+action+in+the+whole+life+of+plants.+Amherst:+University+of+Massachusetts&source=bl&ots=YnboMPvhJi&sig=tJVH30t8eeVbN7vY7prA4Nz4mpl&hl=es-419&sa=X&ei=TM-CUYmRK5Lg8wTc5IDoBg&sqi=2&ved=0CDoQ6AEwAg#v=onepage&q=1977.%20Hormone%20action%20in%20the%20whole%20life%20of%20plants.%20Amherst%3A%20University%20of%20Massachusetts&f=false>

Villalobos, V*. , Thorpe, T**. (2010). Micropropagación, Conceptos, Metodologías y Resultados.

Recuperado de:

http://webapp.ciat.cgiar.org/biotechnology/cultivo_tejidos/capitulo6.pdf



ANEXOS



Tabla 1. Composición de los medios de cultivo Murashige-Skoog MS (1962) suplementado con las hormonas BAP-AIA.

Componentes	Concentración (mg/l)	Soluciones Stock(g)1000 ml	Cantidad requerida (1000ml) 100%	Cantidad requerida (1000ml) 50%
Nitratos NH ₄ NHO ₃ KNO ₃	1650 1900	165g. 190g.	10ml	5ml
Sulfatos MgSO ₄ 7H ₂ O MnSO ₄ H ₂ O ZnSO ₄ 7H ₂ O CuSO ₄ 5H ₂ O	370 16.9 8.6 0.025	37g. 1.69g.(=1690mg/l) 0.86g.(=860mg/l) 0.0025g.(=2.5mg/l)	10ml	5ml
Halógenos CaCl ₂ 2H ₂ O KI CoCl ₂ 2H ₂ O	440 0.83 0.025	44g. 0.083g.(=38mg/l) 0.0025g.(=2.5mg/l)	10ml	5ml
P, B, Mo KH ₂ PO ₄ H ₃ BO ₃ Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	170 6.2 0.25	17g. 0.62g.(=620mg/l) 0.025g.(=2.5mg/l)	10ml	5ml
Na Fe EDTA Fe SO ₄ 7H ₂ O Na ₂ EDTA	27.8 37.24	2.784g. 3.724g.	10ml	5ml
Sacarosa Myo-inositol			30 g. 0.1g	15 g. 0.1g
Vitaminas Glicina Ac. Nicotínico Piridoxina Tiamina		0.2g. 0.05g. 0.05g. 0.01g.	1 ml	0.05ml
Hormonas reguladoras BAP			0.5mg/l 1mg/l 1.5mg/l 2mg/l	
AIA			0.025mg/l 0.05 mg/l 0.075mg/l 0.1 mg/l 0.25mg/l 0.5mg/l 0.75mg/l 1mg/l	
Gel rite			2.4g	
pH.			5.7	



XII. GALERÍA DE IMÁGENES

PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE SIEMBRA.



La preparación del material durante meses, se realizó con el que nos proporciono el laboratorio de Cultivo de Tejido de la UNAN-León para la elaboración de este experimento.

Figura 10. Iniciación del material.



Se hicieron subcultivos suplementados solo con medio MS Ø sin hormonas para poder obtener material libre de contaminantes. Obteniendo un buen desarrollo el cual fue provechoso para lograr iniciar el experimento.

Figura 11. Respuesta positiva de los explantes.



PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO.



Figura 12. Preparación del medio MS.

Ya establecidas las concentraciones de las hormonas, se procedió a la preparación de los medios de cada tratamiento. A estos medios se le agregaron los macro y los micros nutrientes del Medio Murashige y Skoog MS (1862).



Figura 13. El medio se vierte en los frascos.

Así como cada una de las hormonas reguladoras de crecimiento de cada tratamiento. Luego se llevo a la autoclave.



SELECCIÓN Y SIEMBRA DE LOS EXPLANTES



Para dicha siembra se hizo una selección de los mejores explantes.

Figura 14. Realización de los cortes 1.5 cm.



Que tuvieran homogeneidad entre cada uno de ellos, así como las características visibles entre las mismas

Figura 15. Iniciación del tiempo de evaluación.