

**Establecimiento y multiplicación *in vitro* de
malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott)**

Jorge Eduardo Astudillo Robles

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2013

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott)

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Jorge Eduardo Astudillo Robles

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2013

Establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott)

Presentado por:

Jorge Eduardo Astudillo Robles

Aprobado:

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora principal

Renan Pineda, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y Producción
Agropecuaria

Dennis Ramirez, Ph.D.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Establecimiento y multiplicación *in vitro* de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott)

Jorge Eduardo Astudillo Robles

Resumen: Malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott) es una planta herbácea perenne tropical y subtropical perteneciente a la familia de las Aráceas. La producción de semillas de forma natural es rara, por esto la mayoría de los productores utilizan cormos secundarios para la siembra, este método de propagación no es efectivo para mantener plantas libres de enfermedades. La propagación de plántulas a través del cultivo *in vitro* se ha convertido en una herramienta de gran ayuda, se utilizan los meristemas apicales que son desinfectados y sembrados en un medio nutritivo estéril. Los objetivos de este estudio fueron determinar el mejor medio de cultivo para la etapa de establecimiento *in vitro*, cuantificar la producción de brotes en los tres primeros subcultivos de la etapa de multiplicación para determinar el mejor medio de cultivo y determinar el número de subcultivos que debe realizarse en esta etapa. Se probaron medios suplementados con combinaciones auxinas y citocininas (AIB + BAP y ANA + Kinetina). Para la etapa de establecimiento el mejor medio de cultivo fue el suplementado con 0.3 mg/L de AIB + 1 mg/L de BAP. En la etapa de multiplicación el mejor medio de cultivo fue el suplementado con 0.3 mg/L de AIB + 3 mg/L de BAP. Se debe realizar como mínimo tres subcultivos en la etapa de multiplicación para optimizar la producción de brotes por explante.

Palabras clave: BAP, brotes, kinetina, meristema apical.

Abstract: Malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott) is a tropical and subtropical herbaceous perennial plant that belongs to the Araceas family. The seed production is rare, therefore most of the producers use secondary corms for planting, and this propagation method is not effective for maintaining free diseases plants. The production of seedlings by *in vitro* culture techniques has become a very helpful tool. The objectives of this study were to determinate the best culture medium for the *in vitro* establishment stage, to quantify the shoots production in the three first subcultures of the multiplication stage, to determinate the best culture medium and to determinate the number of subcultures that must be done in this stage. There were tested several mediums supplemented with auxin and cytokinin combinations (AIB + BAP and ANA + Kinetin). For the establishment stage the best culture medium was the one supplemented with 0.3 mg/L of AIB + 1 mg/L of BAP. In the multiplication stage, the best culture medium was the supplemented with 0.3 mg/L of AIB + 3 mg/L of BAP. It must be done at least three subcultures in the multiplication stage for optimizing the sprout production per explant.

Key words: Apical meristem, BAP, kinetin, shoots.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de cuadros, figuras y anexos	v
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4 CONCLUSIONES.....	13
5 RECOMENDACIONES.....	14
6 LITERATURA CITADA.....	15
7 ANEXOS	17

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros Página

1. Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de malanga coco.	5
2. Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la etapa de multiplicación <i>in vitro</i> de malanga coco.	7
3. Efecto de hormonas en el número de brotes de malanga en la etapa de establecimiento.....	9
4. Efecto de hormonas en el número de brotes de malanga en el subcultivo 1 de la etapa de multiplicación	10
5. Efecto de hormonas en el número de brotes de malanga en el subcultivo 2 de la etapa de multiplicación	10
6. Efecto de hormonas en el número de brotes de malanga en el subcultivo 3 de la etapa de multiplicación	11

Figuras Página

1. Obtención de ápice de malanga.	4
2. Desinfección de explantes de malanga.	4
3. Siembra de meristemas apicales de Malanga.	5
4. Presencia de raíces a los 28 días en la etapa de establecimiento en el tratamiento Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado, suplementado con 0.2 mg/L de ANA (ácido naftalenacético) y 2 mg/L Kinetina (6-furfurilaminopurina).	9
5. Promedio de número de brotes producidos por explante en la etapa de establecimiento y en los subcultivos de la etapa de multiplicación de malanga coco.	12

Anexos Página

1. Contaminación de los meristemas apicales de malanga coco en la etapa de establecimiento y multiplicación <i>in vitro</i>	17
--	----

1. INTRODUCCIÓN

La malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott) es una planta herbácea perenne tropical y subtropical perteneciente a la familia de las Aráceas, sin tallos aéreos con hojas grandes que provienen de un cormo subterráneo y que forma un pequeño pseudo tallo. Requiere de suelos francos limosos o arenosos con 50 a 60 cm de profundidad ricos en materia orgánica y con un pH de 4.5 a 7.5. El rango óptimo de temperatura para su desarrollo varia de 12 a 30°C, es una planta que necesita mucha humedad disponible en el suelo por lo que se desarrolla bien en zonas con precipitación de 1000 a 1600 mm anuales y en alturas entre 200 a 1000 m.s.n.m. (MCC 2004).

En los países tropicales y subtropicales la malanga coco es un producto valioso que es utilizado como fuente de energía, carbohidratos y proteínas contribuyendo a la seguridad alimentaria. El cormo es la parte principal que se comercializa por ser una fuente importante de producción y almacenamiento de carbohidratos (Ferreira *et al.* 1990). En muchos países en desarrollo la malanga coco es un cultivo que constituye una fuente importante de ingresos para pequeños productores de zonas rurales y marginales, además es una alternativa para zonas donde existen suelos anegados los cuales no son aptos para la mayoría de cultivos (Viloria y Córdova 2008).

La producción de semillas de forma natural de malanga coco es relativamente rara, en la actualidad se está utilizando la hormona giberelina para la inducción de flores y semillas, la utilización de estas semillas como forma de propagación generan gran variabilidad fenotípica y genotípica porque es un cultivo de polinización cruzada, esta variación afecta la producción en cada cosecha. Debido a que la producción de semillas demanda un tratamiento hormonal en la plantación, la mayoría de los productores utilizan los cormos secundarios con tres a cinco hojas para la siembra, este método de propagación no es efectivo para mantener plantas libres de enfermedades (FAO s.f).

La propagación de plántulas de malanga coco a través del cultivo *in vitro* se ha convertido en una herramienta de gran ayuda para la producción rápida, masiva y libre de enfermedades (Salazar 1991). Para este tipo de propagación se utilizan los meristemas apicales que son desinfectados y sembrados en un medio nutritivo estéril para producir plantas con raíces y brotes que son transferidas a macetas en invernadero y finalmente sembradas en el campo, con este método se facilita multiplicar muy rápido clones élites (FAO s.f). El principal beneficio del cultivo *in vitro* de malanga coco es la producción de plántulas libres del virus del mosaico de la malanga, este virus es el más difundido en el cultivo de las aráceas (Cabrera *et al.* 2010).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Determinar el mejor medio de cultivo para la etapa de establecimiento *in vitro* de malanga coco utilizando dos tipos de citocininas y auxinas en diferentes concentraciones para inducir la formación de brotes.
- Cuantificar la producción de brotes en los diferentes subcultivos de la etapa de multiplicación para determinar el mejor medio de cultivo.
- Determinar el número de subcultivos que debe realizarse en la etapa de multiplicación para optimizar la producción de brotes.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Establecimiento *in vitro* de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott).

Material vegetal. Se utilizaron cormos libres de enfermedades para la obtención de los meristemas apicales (Figura 1). Los cormos fueron sometidos a un proceso de desinfección superficial (Figura 2), se lavaron tres veces con agua corriente y jabón líquido comercial, luego fueron sumergidos en alcohol al 70% por un minuto, después se sumergieron por 30 minutos en una solución de NaClO al 30% (v/v) (cloro líquido comercial con hipoclorito de sodio al 4.72% de ingrediente activo) a esta solución se le aplicó dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml de la solución. Dentro de la cámara de flujo laminar se decantó la solución de NaClO y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril.

Medio de cultivo. Se evaluaron tres medios de cultivo semisólidos basados en el de Murashige y Skoog (MS) (1962) (Cuadro 1), suplementado con:

- Tratamiento A 0.3 mg/L de AIB (ácido indol butírico) + 1 mg/L de BAP (6-bencilaminopurina)
- Tratamiento B 0.3 mg/L de AIB + 2 mg/L de BAP
- Tratamiento C 0.2 mg/L de ANA (ácido naftalenacético) + 2 mg/L Kinetina (6-furfurilaminopurina)

Para la preparación de los medios de cultivo semisólidos se utilizó agua destilada, Phytigel[®] (1.8 g/L), se ajustó el pH a 5.7 utilizando KOH y HCL, se dispensó 20 ml en cada frasco que fue sellado con papel aluminio, estos fueron esterilizados en autoclave a 15 PSI, 120°C por 20 minutos.

Siembra de material vegetal. Las cámaras de flujo laminar fueron encendidas 30 minutos antes de la siembra y desinfectadas con alcohol al 70%, las herramientas se esterilizaron con calor seco a 250°C por 15 segundos. Los explantes que se encontraban en la solución de NaClO 30% (v/v) (cloro líquido comercial con hipoclorito de sodio al 4.72% de ingrediente activo) fueron enjuagados 3 veces con agua destilada estéril para luego proceder a la remoción de las capas externas hasta obtener el meristema apical dejándolo con una altura de aproximadamente un centímetro (Figura 3), en este proceso se utilizó pinzas y bisturís estériles.

Los meristemas apicales ya desinfectados y luego de pasar por todo el proceso de remoción de capas externas fueron colocados en los frascos con medio estéril y llevados al cuarto de crecimiento donde permanecieron 28 días a una temperatura de 22°C, 60% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.



Figura 1. Obtención de ápice de malanga. A- cormo y pseudo tallo, B- remoción de cormo y pseudo tallo, C- interior del cormo y pseudo tallo, D- ápice de 5 cm listo para la desinfección.

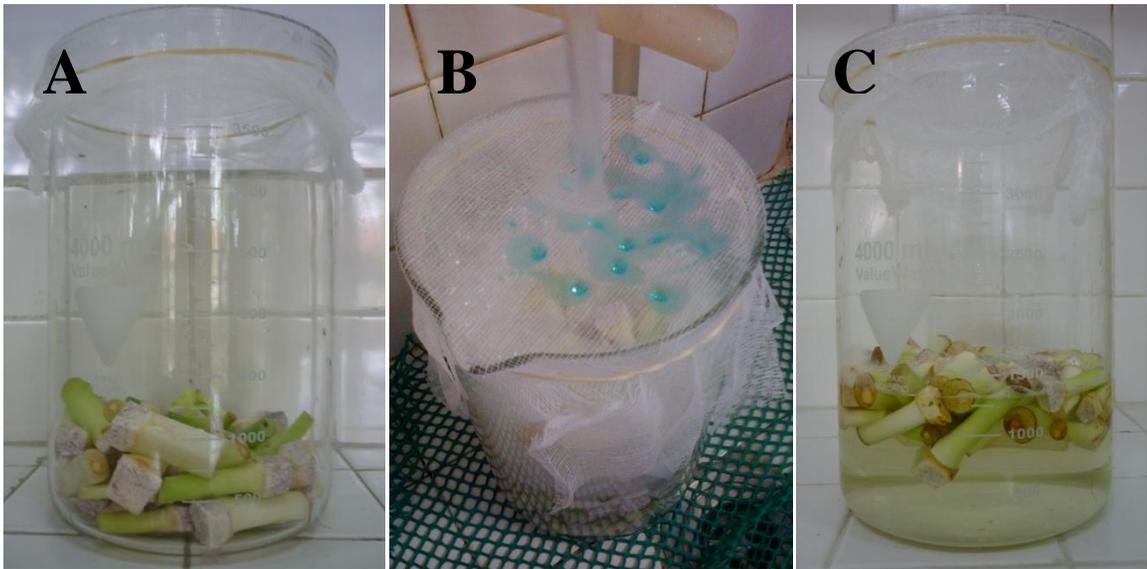


Figura 2. Desinfección de explantes de malanga. A- ápices libres de pseudo tallo y cormo, B- Lavado de ápices con agua corriente y jabón comercial, C- explantes sumergidos en NaClO 30% (v/v) con Tween 80 por 30 minutos.

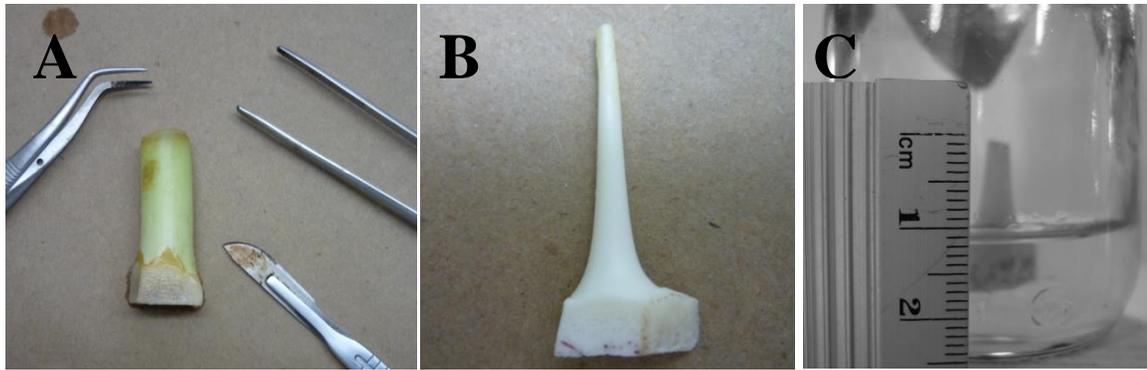


Figura 3. Siembra de meristemas apicales de malanga. A- ápice luego de tres enjuagues con agua destilada estéril. B- meristema apical libre de pseudo tallo. C- meristema apical en frasco con medio de crecimiento.

Cuadro 1. Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la etapa de establecimiento *in vitro* de malanga coco (*Colocasia esculenta* (L.) Schott).

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L	
Macro elementos	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cloruro de calcio bihidratado	440.000	
	KH_2PO_4	Fosfato monobásico de potasio	170.000	
	KNO_3	Nitrato de potasio	1,900.000	
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000	
	NH_4NO_3	Nitrato de amonio	1,650.000	
	Micro elementos	H_3BO_3	Ácido bórico	6.200
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		Sulfato de cobre pentahidratado	0.025	
KI		Yoduro de potasio	0.830	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		Molibdato de sodio bihidratado	0.250	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		Sulfato de zinc heptahidratado	8.600	
Hierro		FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes Orgánicos			Myo-inositol	100.000
			Tiamina-HCL	0.400
		Sacarosa	30,000.000	

Fuente: CIAT 1991.

Multiplicación *in vitro* de malanga coco (*Colocasia esculenta* (L.) Schott). Luego de 28 días de permanecer los meristemas apicales en la etapa de establecimiento se los cambió al medio de multiplicación. En la etapa de multiplicación de malanga coco se realizaron tres cambios de medio de cultivo cada 21 días, utilizando el mismo medio de cultivo basal para cada tratamiento en los tres cambios. Para esta etapa se aumentó la concentración de citocininas y se mantuvo la concentración de auxinas.

Medio de cultivo. Se evaluaron tres medios de cultivo semisólidos basados en el de Murashige y Skoog (MS) (1962) para la etapa de multiplicación (Cuadro 2), suplementado para cada tratamiento con:

- Tratamiento A 0.3 mg/L de AIB (ácido indol butírico) + 3 mg/L de BAP (6-bencilaminopurina)
- Tratamiento B 0.3 mg/L de AIB + 4 mg/L de BAP
- Tratamiento C 0.2 mg/L de ANA (ácido naftalenacético) + 4 mg/L Kinetina (6-furfurilaminopurina)

Siembra de material vegetal. Luego del establecimiento se realizó el cambio de medio de cultivo que corresponde a la etapa de multiplicación, previo a la siembra de cada uno de los cambios de esta etapa se eliminó raíces y tejido superficial que cubría los meristemas apicales, se cuantificó los brotes que se presentaron y se colocó los meristemas y brotes individuales en frascos con el medio correspondiente a cada tratamiento.

Datos a evaluar. Se evaluó el número de brotes al finalizar la etapa de establecimiento y en los tres subcultivos que se realizaron en la etapa de multiplicación. Los datos se tomaron a los 28 días de la siembra y luego cada 21 días hasta finalizar la etapa de multiplicación.

Diseño experimental. Se utilizó un Diseño Completo al Azar (DCA), teniendo tres tratamientos con tres repeticiones y cada repetición con 45 unidades experimentales. Se realizó el análisis de varianza ANDEVA, y una separación de medias con el método DUNCAN con un nivel de significancia de $P \leq 0.05$. Los datos fueron analizados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®]) (SAS 2009).

Cuadro 2. Medio basal Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado para la etapa de multiplicación *in vitro* de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott).

Componente	Fórmula	Nombre común	mg/L	
Macro elementos	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000	
	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000	
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1,900.000	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000	
		NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1,650.000
	Micro elementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
CoCl ₂ .6H ₂ O		Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025	
				0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O		Sulfato de cobre pentahidratado		
KI		Yoduro de potasio	0.830	
MnSO ₄ .4H ₂ O		Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		Molibdato de sodio bihidratado	0.250	
ZnSO ₄ .7H ₂ O		Sulfato de zinc heptahidratado	8.600	
Hierro		FeNa EDTA	Sal férrica sódica de ácido etilendiaminotetraacético	50.000
Componentes Orgánicos			Myo-inositol	100.000
		Tiamina-HCL	1.000	
		Glicina	2.000	
		Ácido Nicotínico	0.500	
		Piridoxina	0.500	
		Sacarosa	20,000.000	

Fuente: CIAT 1991.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la etapa de establecimiento *in vitro* de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott) la producción de brotes fue muy baja y no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 3). Estos datos concuerdan con Saucedo Aguiar *et al.* (2008) quienes analizaron diferentes medios de cultivo para la etapa de establecimiento y concluyeron que las concentraciones de 0.3 mg/L de AIB (ácido indol butírico) + 1 mg/L de BAP (6-bencilaminopurina) y 0.3 mg/L de AIB + 2 mg/L de BAP no presentaron diferencias significativas en cuanto a la producción de brotes.

El medio suplementado con 0.2 mg/L de ANA + 2 mg/L Kinetina no presentó diferencia significativa al compararlo con los tratamientos suplementados con BAP, este resultado es similar a los obtenidos por Monge *et al.* (1987) quienes demostraron que al suplementar dosis de 2 mg/L de Kinetina (6-furfurilaminopurina) en la etapa de establecimiento inhibe el desarrollo de brotes si no existe una adecuada relación entre auxinas y citocininas.

En el tratamiento suplementado con 0.2 mg/L de ANA + 2 mg/L Kinetina presentó una producción baja de brotes, pero se observó formación de sistema radicular en los explantes, en promedio 1.77 raíces por planta en cada una de las unidades experimentales (Figura 4), este promedio superó al número de brotes por planta (1.12 ± 0.32) (Cuadro 3). La presencia de raíces al utilizar 0.2 mg/L de ANA + 2 mg/L Kinetina coincide con el estudio realizado por Salazar (1991) en aráceas comestibles.

La presencia de raíces en el medio suplementado con 0.2 mg/L de ANA + 2 mg/L Kinetina fue cuantificada a los 28 días cuando finalizó la etapa de establecimiento. En esta etapa no se busca inducir la presencia de raíces, pero su presencia se debió a un mal balance entre auxinas y citocininas. Las citocininas en cultivo *in vitro* se usan para romper la dominancia apical, promover la división celular y la producción de brotes axilares, las auxinas en combinación con las citocininas promueven el desarrollo de los brotes, un mal balance entre auxinas y citocininas provoca que el explante produzca raíces y se alargue sin sufrir división celular que promueva la formación de brotes (UPV s.f). La división celular inducida por Kinetina no se produce si no hay presencia de auxinas, combinar Kinetina con AIA (ácido indol acético) fomenta una mejor división celular y desarrollo de brotes (Taiz y Zeiger 2006).

Cuadro 3. Efecto de hormonas en el número de brotes de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) en la etapa de establecimiento, utilizando el medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado.

Tratamiento	Media \pm D.E. ^o
MS + 0.3 mg/L de AIB + 1 mg/L de BAP ^Ω	1.14 ^{at} \pm 0.35
MS + 0.3 mg/L de AIB + 2 mg/L de BAP	1.23 ^a \pm 0.42
MS + 0.2 mg/L de ANA + 2 mg/L Kinetina ^Y	1.12 ^a \pm 0.32

^t Los promedios con letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan (P= 0.1050).

^o Media= promedio de número de brotes producidos por explante. D.E= desviación estándar.

^Ω BAP= 6-bencilaminopurina. AIB= Ácido indol butírico.

^Y Kinetina= 6-furfurilaminopurina. ANA= Ácido naftalenacético.



Figura 4. Presencia de raíces a los 28 días en la etapa de establecimiento en el medio Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado, suplementado con 0.2 mg/L de ANA (ácido naftalenacético) + 2 mg/L Kinetina (6-furfurilaminopurina). A- explante con presencia de raíces. B- raíces y hojas en malanga coco. C- explante sin presencia de brotes.

En los tres medios evaluados en el primer subcultivo de la etapa de multiplicación, se observó que no hay diferencias significativas entre los tratamientos (Cuadro 4). Estos datos son similares a los obtenidos por Saucedo Aguiar *et al.* (2008) quienes no encontraron diferencias significativas al suplementar 3 y 4 mg/L de BAP al medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962).

Cuadro 4. Efecto de hormonas en el número de brotes de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) en el subcultivo 1 de la etapa de multiplicación, utilizando el medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado.

Tratamiento	Media ± D.E^u
MS + 0.3 mg/L de AIB + 3 mg/L de BAP ^Ω	1.30 ^{a t} ± 0.46
MS + 0.3 mg/L de AIB + 4 mg/L de BAP	1.48 ^a ± 0.63
MS + 0.2 mg/L de ANA + 4 mg/L Kinetina ^Ÿ	1.50 ^a ± 0.63

^t Los promedios con letras iguales no son significativamente diferentes según la prueba de Duncan (P= 0.0876).

^u Media= promedio de número de brotes producidos por explante. D.E= desviación estándar.

^Ω BAP= 6-bencilaminopurina. AIB= Ácido indol butírico.

^Ÿ Kinetina= 6-furfurilaminopurina. ANA= Ácido naftalenacético.

Para el segundo subcultivo de la etapa de multiplicación no se encontró diferencias significativas para el número de brotes al usar diferentes concentraciones de BAP. Al comparar los tratamientos que contienen BAP con el que contiene Kinetina se observó el mayor número de brotes al suplementar 3 y 4 mg/L de BAP al medio de cultivo semisólido Murashige y Skoog (MS) (1962) (Cuadro 5).

Estos datos concuerdan con Saucedo Aguiar *et al.* (2008) quienes al suplementar 3 y 4 mg/L de BAP en el medio Murashige y Skoog (MS) (1962) para el segundo subcultivo no encontraron diferencias significativas entre los tratamientos que contenían estas concentraciones. La baja producción de brotes en el tratamiento suplementado con Kinetina se debe a que a valores mayores de 2 mg/L suplementados al medio de cultivo con un mal balance de auxinas, inhibe la producción de brotes (Monge *et al.* 1987).

Cuadro 5. Efecto de hormonas en el número de brotes de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) en el subcultivo 2 de la etapa de multiplicación, utilizando el medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado.

Tratamiento	Media ± D.E^u
MS + 0.3 mg/L de AIB + 3 mg/L de BAP ^Ω	4.25 ^{a t} ± 2.06
MS + 0.3 mg/L de AIB + 4 mg/L de BAP	3.87 ^a ± 1.65
MS + 0.2 mg/L de ANA + 4 mg/L Kinetina ^Ÿ	1.68 ^b ± 0.76

^t Los promedios con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Duncan (P= 0.0102).

^u Media= promedio de número de brotes producidos por explante. D.E= desviación estándar.

^Ω BAP= 6-bencilaminopurina. AIB= Ácido indol butírico.

^Ÿ Kinetina= 6-furfurilaminopurina. ANA= Ácido naftalenacético.

En el tercer subcultivo de la etapa de multiplicación se observó que no existen diferencias significativas para el número de brotes de los medios que contienen 3 y 4 mg/L de BAP, pero estos medios presentaron la mayor producción de brotes al compararlos con el medio que contiene 4 mg/L de Kinetina (Cuadro 6). En el medio que contiene 4 mg/L de Kinetina y 0.2 mg/L de ANA se observó la presencia de raíces en los tres subcultivos de la etapa de multiplicación.

Estos datos coinciden con Vilchez *et al.* (2009) quienes obtuvieron los mejores resultados al suplementar 3 y 4 mg/L de BAP en todos los subcultivos de la etapa de multiplicación. Para Reyes y Vera Barahona (2004) la adición de 3 y 4 mg/L de BAP provoca una mayor proliferación de brotes axilares porque la citocinina rompe al dominancia apical y estimula la formación de yemas que se encuentran en las axilas de las hojas, ellos también exponen que la adición de auxinas es necesaria para estimular el crecimiento de los brotes.

Cuadro 6. Efecto de hormonas en el número de brotes de malanga (*Colocasia esculenta* L. Schott) en el subcultivo 3 de la etapa de multiplicación, utilizando el medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado.

Tratamiento	Media \pm D.E ^o
MS + 0.3 mg/L de AIB + 3 mg/L de BAP ^Ω	8.67 ^a ^l \pm 2.35
MS + 0.3 mg/L de AIB + 4 mg/L de BAP	8.10 ^a \pm 2.79
MS + 0.2 mg/L de ANA + 4 mg/L Kinetina ^Ÿ	3.44 ^b \pm 1.43

^l Los promedios con letras diferentes son significativamente diferentes según la prueba de Duncan (P= 0.0001).

^o Media= promedio de número de brotes producidos por explante. D.E= desviación estándar.

^Ω BAP= 6-bencilaminopurina. AIB= Ácido indol butírico.

^Ÿ Kinetina= 6-furfurilaminopurina. ANA= Ácido naftalenacético.

En todos los tratamientos se observó que a medida que se aumenta el subcultivo la producción de brotes es mayor. Durante el establecimiento y subcultivo 1 no se presentaron diferencias significativas en cuanto a la producción de brotes, en el subcultivo 2 y 3 la producción de brotes aumentó, los tratamientos suplementados con 3 mg/L de BAP + 0.3 mg/L de AIB y 4 mg/L de BAP + 0.3 mg/L presentaron la mayor producción de brotes a los 91 días después de la etapa de establecimiento. Estos tratamientos aumentaron en 7.53 y 6.87 brotes en promedio por explante respectivamente desde la etapa de establecimiento (Figura 5).

Estos datos coinciden con los obtenidos por Saucedo Aguiar *et al.* (2008) quienes observaron que a medida que se aumenta el número de subcultivo hay una tendencia al incremento del número de brotes por explante. Para Vilchez *et al.* (2009) el incremento del número de brotes por explante a medida se aumenta el número de subcultivo se debe al efecto de adaptación que van experimentando los explantes en los medios de cultivo

con reguladores de crecimiento, porque estos explantes se habitúan a las fitohormonas a medida se aumenta el número de subcultivos.

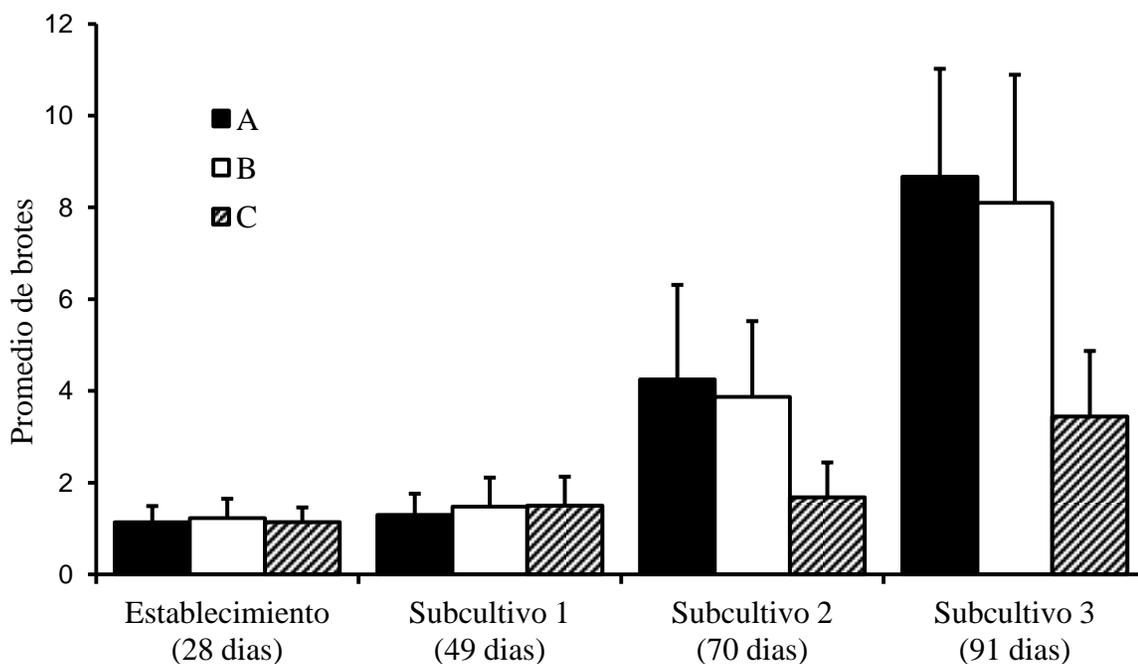


Figura 5. Promedio de número de brotes producidos por explante en la etapa de establecimiento y en los subcultivos de la etapa de multiplicación de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott) utilizando el medio Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado y suplementado para cada tratamiento con: A- establecimiento: 0.3 mg/L AIB + 1 mg/L BAP; subcultivo 1, 2 y 3: 0.3 mg/L AIB + 3 mg/L BAP. B- establecimiento: 0.3 mg/L AIB + 2 mg/L BAP; subcultivo 1, 2 y 3: 0.3 mg/L AIB + 4 mg/L BAP. C- establecimiento: 0.2 mg/L ANA + 2 mg/L Kinetina; subcultivo 1, 2 y 3: 0.2 mg/L ANA + 4 mg/L Kinetina.

4. CONCLUSIONES

- En la etapa de establecimiento de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott) se observó que no existe diferencia significativa en el número de brotes entre los tratamientos suplementados con citocininas (BAP y Kinetina) y auxinas (AIB y ANA) en el medio de cultivo semisólido Murashige y Skoog (MS) (1962) modificado.
- En la etapa de multiplicación el mejor medio fue el suplementado con 0.3 mg/L de AIB + 3 mg/L de BAP.
- Se debe realizar como mínimo tres subcultivos en la etapa de multiplicación para optimizar la producción de brotes por explante.

5. RECOMENDACIONES

- Continuar con la etapa de multiplicación, para determinar el número de subcultivos que se debe realizar antes de que la producción de brotes comience a decrecer.
- Continuar la investigación para la etapa de enraizamiento y aclimatación.
- Comparar la producción en campo de plantas propagadas convencionalmente con plantas producidas en laboratorio.

6. LITERATURA CITADA

Cabrera, D., J. González., O. Portal y R. Hernández. 2010. Influencia del virus del mosaico de la malanga sobre el contenido de clorofilas en *Xanthosoma nigrum* (VELL.) Genotipo INIVIT M 95-1 (en línea). Consultado el 12 de septiembre de 2013. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522010000300008&script=sci_arttext

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W., Mroginski, L (eds), Cali, Colombia. p 469-481.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation). s.f. Taro cultivation in Asia and the Pacific (en línea). Consultado 11 de septiembre de 2013. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/ac450e/ac450e03.htm>

Ferreira, S., E. Ortiz y C. Pardo. 1990. Estudio químico bromatológico de la *Colocasia esculenta* (taro) (en línea). Consultado el 12 de septiembre de 2013. Disponible en: <http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/farmacia/revista/V18P53-59.pdf>

MCC (Millenium Challenge Corporation, United States of America). 2004. Cultivo de malanga coco. Nicaragua. 15 p.

Monge, M., O. Arias y P. Ramirez. 1987. Obtención de plantas de tiquizque blanco (*xanthosoma sagittifolium*), de tiquizque morado (*Xanthosoma violaceum*) y de ñampi (*Colocasia esculenta*) libre de virus por medio del cultivo *in vitro* de ápices. Agronomía costarricense 11(1): 71-79.

Reyes, X y J. Vera Barahona. 2004. Efecto de reguladores de crecimiento en las diferentes fases de la propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L Schott). Tesis Ing. Agropecuario. Los Ríos, Ecuador, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. p 5.

Salazar, S. 1991. Micropropagación de aráceas comestibles. In: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W., Mroginski, L (eds), Cali, Colombia. p 471.

SAS. 2009. SAS User Guide. Statistical Analysis Institute Inc., Cary, N.C., United States of America.

Saucedo Aguiar, S.G., L.E. Ramos Gavilanes y T.X. Reyes Chancay. 2008. Efecto de los reguladores de crecimiento para la propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L Schott). Ciencia y tecnología 1: 17-21.

Taiz, L y E. Zeiger. 2006. Fisiología vegetal. 2 ed, Castellón, España, Publicacions de la Universitat Jaume, 2 v, p 497.

UPV (Universidad Politécnica de Valencia). s.f. Fitorreguladores (en línea). Consultado el 30 de septiembre de 2013. Disponible en:
[http://www.euita.upv.es/variados/biologia/temas/tema_14.htm#Miller y Skoog descubrieron la kinetina, una citoquinina artificial.](http://www.euita.upv.es/variados/biologia/temas/tema_14.htm#Miller_y_Skoog_descubrieron_la_kinetina,_una_citoquinina_artificial)

Vilchez, J., Y. Rivas, N. Albany, M. Molina y L. Martinez. 2009. Efecto de la N⁶-bencilaminopurina sobre la multiplicación *in vitro* de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). Revista de la facultad de agronomía 26: 212-222.

Viloria, H y C. Cordova. 2008. Sistema de producción de ocumo chino (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) en la parroquia Manuel Renaud del municipio de Antonio Diaz del estado Delta Amacuro, Venezuela. Revista UDO agrícola 8 (1): 98-106.

7. ANEXOS

Anexo 1. Contaminación ocasionada por bacterias y hongos en los meristemas apicales de malanga coco (*Colocasia esculenta* L. Schott) en la etapa de establecimiento y multiplicación *in vitro*.

Etapa	Contaminación	
	Hongos (%)	Bacterias (%)
Establecimiento	1.48	1.15
Multiplicación	0.70	1.96