

**Establecimiento *in vitro* de yuca –variedad
valencia- mediante domos meristemáticos y
evaluación de tres medios de cultivo para la
producción de brotes**

Carlos Diego Buechsel Reyes

**Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012**

ZAMORANO
DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Establecimiento *in vitro* de yuca -variedad
valencia- mediante domos meristemáticos y
evaluación de tres medios de cultivo para la
producción de brotes**

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

Presentado por:

Carlos Diego Buechsel Reyes

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2012

Establecimiento *in vitro* de yuca -variedad valencia- mediante domos meristemáticos y evaluación de tres medios de cultivo para la producción de brotes

Presentado por:

Carlos Diego Buechsel Reyes

Aprobado:

María Alexandra Bravo, M.Sc.
Asesora principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Departamento de Ciencia y
Producción Agropecuaria

Ulises Barahona, Ing. Agr.
Asesor

Raúl Zelaya, Ph.D.
Decano Académico

Dinie de Rueda, M.Sc.
Asesora

RESUMEN

Buechsel Reyes, C. D. 2012. Establecimiento *in vitro* de yuca –variedad valencia- mediante domos meristemáticos y evaluación de tres medios de cultivo para la producción de brotes. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 18 p.

La yuca (*Manihot esculenta* C.) es un arbusto perenne perteneciente a la familia Euphorbiaceae, originaria de América del Sur. La yuca es considerada la cuarta fuente de carbohidratos y calorías más importante de las regiones tropicales. La producción de yuca en Honduras surge como una buena alternativa para los productores, ya que genera rendimientos altos y se adapta a las condiciones climáticas del país, además de que su demanda aumenta en el mercado local e internacional. El método tradicional de propagación de yuca por estaca permite el almacenamiento de germoplasma y rápido crecimiento de la planta, pero transmite enfermedades. Por lo que la micropropagación es una alternativa para suplir las necesidades de multiplicación masiva de yuca, además de que permite obtener plantas sanas y de buena calidad. Este estudio evaluó el establecimiento *in vitro* de *Manihot esculenta* C. –variedad valencia- utilizando domos meristemáticos provenientes de yemas axilares y la producción de brotes probando tres tratamientos con diferentes concentraciones de sacarosa y el regulador de crecimiento 6-Bencil Aminopurina (BAP). El establecimiento *in vitro* de *Manihot esculenta* C. utilizando como explantes domos meristemáticos, permitió mejor eficiencia de la desinfección. El tratamiento con 0.5 mg/L de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y 40 g/L de Sacarosa, fue el que generó una producción de brotes precoz y mayor producción de nudos.

Palabras clave: Carbohidratos, fitohormonas, *Manihot esculenta*, micropropagación, sacarosa.

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.....	14
5 RECOMENDACIONES.....	15
6 LITERATURA CITADA.....	16
7 ANEXOS.....	18

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros		Página
1.	Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) modificado, utilizado en el establecimiento <i>in vitro</i> de domos meristemáticos de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia-.....	5
2.	Tratamientos para producción de brotes <i>in vitro</i> a partir de microesquejes obtenidos de domos meristemáticos de <i>Manihot esculenta</i> -variedad valencia-, en combinación de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y Sacarosa.....	6
3.	Efecto de las concentraciones de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y Sacarosa, en la producción de brotes de <i>Manihot esculenta</i> -variedad valencia- a los 14 días de haberse implementado el tratamiento.....	10
4.	Efecto de las concentraciones de 6-Bencil Aminopurina(BAP) y Sacarosa, en la producción de brotes de <i>Manihot esculenta</i> -variedad valencia- a los 24 días de haberse implementado el tratamiento.....	11
5.	Efecto de las concentraciones de 6-Bencil Aminopurina(BAP) y Sacarosa, en la producción de brotes de <i>Manihot esculenta</i> -variedad valencia- a los 34 días de haberse implementado el tratamiento.....	12
6.	Efecto de las concentraciones de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y Sacarosa, en la producción de nudos por microesqueje de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia- a los 34 días de haberse implementado el tratamiento.....	12
Figuras		Página
1.	Plantación de <i>Manihot esculenta</i> -variedad valencia-, ubicada en el área de Hortalizas de la Escuela Agrícola Panamericana de la cual se obtuvieron los explantes para el establecimiento <i>in vitro</i>	3
2.	Preparación, desinfección y extracción de explantes de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia-.....	4
3.	Domo meristemático aséptico de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia-.....	8
4.	Microesqueje desarrollados a partir de domos meristemáticos de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia- al inicio de los tratamientos de producción de brotes.	9

5. Microesquejes de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia- a los 14 días de haberse implementado los tratamientos de producción de brotes.....	9
6. Microesqueje de <i>M. esculenta</i> –variedad valencia- con formación de raíces.....	9
7. Microesquejes de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia- a los 24 días de haberse implementado los tratamientos de producción de brotes.....	10
8. Microesquejes de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia- a los 34 días de haberse implementado los tratamientos de producción de brotes.....	11
9. Formación de callos de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia- en el tratamiento Y1 0.50-20.....	13

Anexos

Página

1. Contaminación por hongos y bacterias de yemas axilares utilizadas para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia-.....	18
2. Contaminación en yemas axilares de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia-.....	18
3. Sobrevivencia, contaminación por hongos y bacterias de domos meristemáticos utilizados para el establecimiento <i>in vitro</i> de <i>Manihot esculenta</i> –variedad valencia-.....	18

1. INTRODUCCIÓN

La yuca (*Manihot esculenta* C.) es un arbusto perenne perteneciente a la familia Euphorbiaceae, la cual esta compuesta por 7200 especies, caracterizadas por tener notable desarrollo en sus vasos lactíferos, que contienen las células secretoras galactocitos, encargadas de producir la secreción lechosa que caracteriza a las plantas de esta familia (Ceballos y de la Cruz 2002).

La yuca es originaria de América del Sur, su domesticación se remonta a 5,000 años atrás y se cultiva extensivamente desde entonces en zonas tropicales y subtropicales, específicamente a latitudes menores de 30° y altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 1800 m.s.n.m. (Ceballos 2002).

La importancia del cultivo de yuca radica en la diversidad de sus usos, ya que sus raíces y hojas pueden ser utilizadas para el consumo humano o animal, así mismo de esta se pueden obtener almidón y alcohol que pueden ser utilizados en la industria (Ceballos 2002).

Las raíces de la yuca pueden ser comercializadas como raíz fresca para consumo humano, como insumo en la industria alimenticia, como materia prima para producir alimentos balanceados de animales y para uso en la industria no alimenticia (Marín *et al.* 2009).

La yuca es considerada la cuarta fuente de energía más importante de las regiones tropicales del mundo (FAO 2000) únicamente antecedida por el maíz, la caña de azúcar y el arroz (Ceballos 2002), por lo que es un cultivo importante como fuente de carbohidratos y calorías para millones de personas en el trópico (Marín *et al.* 2009).

La producción de yuca en Honduras surge como una alternativa a los productores para diversificar sus cultivos además de que ayuda a mejorar las bajas ganancias obtenidas por la siembra de otros cultivos. La variedad de yuca -valencia- esta empezando a tener auge entre los productores debido a sus rendimientos altos en comparación a otras variedades y a su adaptación a las condiciones climáticas que imperan en gran parte del país. A lo anterior se suma el impacto económico que ha tenido esta variedad ya que su demanda para mercado local e internacional tiene un crecimiento constante (Fintrac 2002).

Los métodos tradicionales de propagación de yuca, como el de propagación por estaca tiene ventajas de almacenamiento de germoplasma y rápido crecimiento, pero presenta problemas de transmisión de patógenos sistémicos como: *Diplodia manihotis* y *Xantomonas axonopodi*; transmisión de plagas como: barrenadores del tallo, escamas, huevos de insectos y acaros (López 2002); además de que genera bajas tasas de

multiplicación y la necesidad de realizar la práctica de eliminación de brotes para dejar el más vigoroso y facilitar la fertilización, lo cual aumenta la implementación de mano de obra (Fintrac 2002).

Por lo que surge la micropropagación *in vitro* como una alternativa para suplir las necesidades de multiplicación masiva de yuca, además de que permite obtener plántulas sanas, de buena calidad (Marín *et al.* 2009) y material vegetal para siembra en cualquier época del año.

El cultivo de tejidos vegetales es una alternativa que permite mantener la conservación de germoplasma en pequeños espacios, libres del ataque de enfermedades, además de facilitar el intercambio de germoplasma (Rayas *et al.* 2002). Además de que permite la utilización de termoterapia para la exclusión de virus, con lo que se aseguran plántulas totalmente asépticas, para un buen crecimiento de las mismas (Roca *et al.* 1991)

- Este estudio busca evaluar el establecimiento *in vitro* de *Manihot esculenta* C. – variedad valencia- utilizando domos meristemáticos provenientes de yemas axilares.
- Así mismo posterior al establecimiento *in vitro* se busca producir brotes de los microesquejes provenientes de domos meristemáticos probando tres tratamientos resultantes de las combinaciones del regulador de crecimiento 6-Bencil Aminopurina (BAP) en concentraciones de 0.04 mg/L y 0.5 mg/L, y sacarosa en concentraciones de 20 g/L y 40 g/L.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Carrera de Ingeniería Agronómica, de la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, ubicada en el Valle del Yeguaré, a 30 kilómetros de Tegucigalpa Honduras.

Fuente del explante. Las yemas axilares que se utilizaron en el experimento fueron obtenidas de una plantación de Yuca (*Manihot esculenta*) -variedad valencia-, ubicada en el área de Hortalizas de la Escuela Agrícola Panamericana (Figura 1).



Figura 1. Plantación de *Manihot esculenta* -variedad valencia-, ubicada en el área de Hortalizas de la Escuela Agrícola Panamericana de la cual se obtuvieron los explantes para el establecimiento *in vitro*.

Las yemas axilares se recolectaron cuando la planta de *M. esculenta* tenía 7 meses de haber sido sembrada y se encontraba en estado reproductivo. La recolección de explantes se realizó cortando en la parte aérea de la planta segmentos de tallo de aproximadamente 20 cm de largo con yemas axilares, a los segmentos de tallos se les eliminaron las hojas y pecíolos dejando únicamente 1.5 cm de pecíolo del tallo hacia el área foliar. Posterior a la recolección de explantes, estos fueron llevados al laboratorio donde fueron sometidos a desinfección, preparación, establecimiento y posteriores tratamientos para la producción de brotes.

Desinfección de explantes. Las estacas de aproximadamente 20 cm de largo que contenían yemas axilares fueron colocadas durante 24 horas en una solución de 2 g/L de Benlate[®] (fungicida sistémico con acción protectante y curativa, de ingrediente activo

Benomyl) y 2 g/L de Agri-mycin[®] (bactericida sistémico, de ingredientes activos Estreptomycin y Oxitetraciclina) disueltos en agua destilada (Figura 2. A), luego las yemas fueron removidas de las estacas (Figura 2. B) y se les quitaron las estípulas (Figura 2. C) para ser lavadas con agua y jabón, después fueron sumergidas en ETOH al 70% durante 5 segundos, posteriormente fueron sumergidas durante 10 minutos en una solución de NaOCl (hipoclorito de sodio) al 10% (v/v) con dos gotas de Tween 80 por cada 100 ml, preparada con agua destilada estéril. Seguidamente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se finalizó con la eliminación de todas las capas de primordios foliares que cubren el domo meristemático (Figura 2. D). Debido a que el establecimiento *in vitro* con yemas hace propensa la contaminación con hongos y bacterias.

Las dos inmersiones, los enjuagues y la eliminación de primordios foliares fueron realizadas en cámara de flujo laminar horizontal marca EACIN (“Environmental Air Control, Inc.”). El Tween 80 o polisborato 80, es un éster de sorbitol de polietileno que fue utilizado como agente tenso activo (SIGMA-ALDRICH). Se utilizó cloro comercial (Magia Blanca[®] al 4.72% i.a) para preparar la solución de NaOCl.

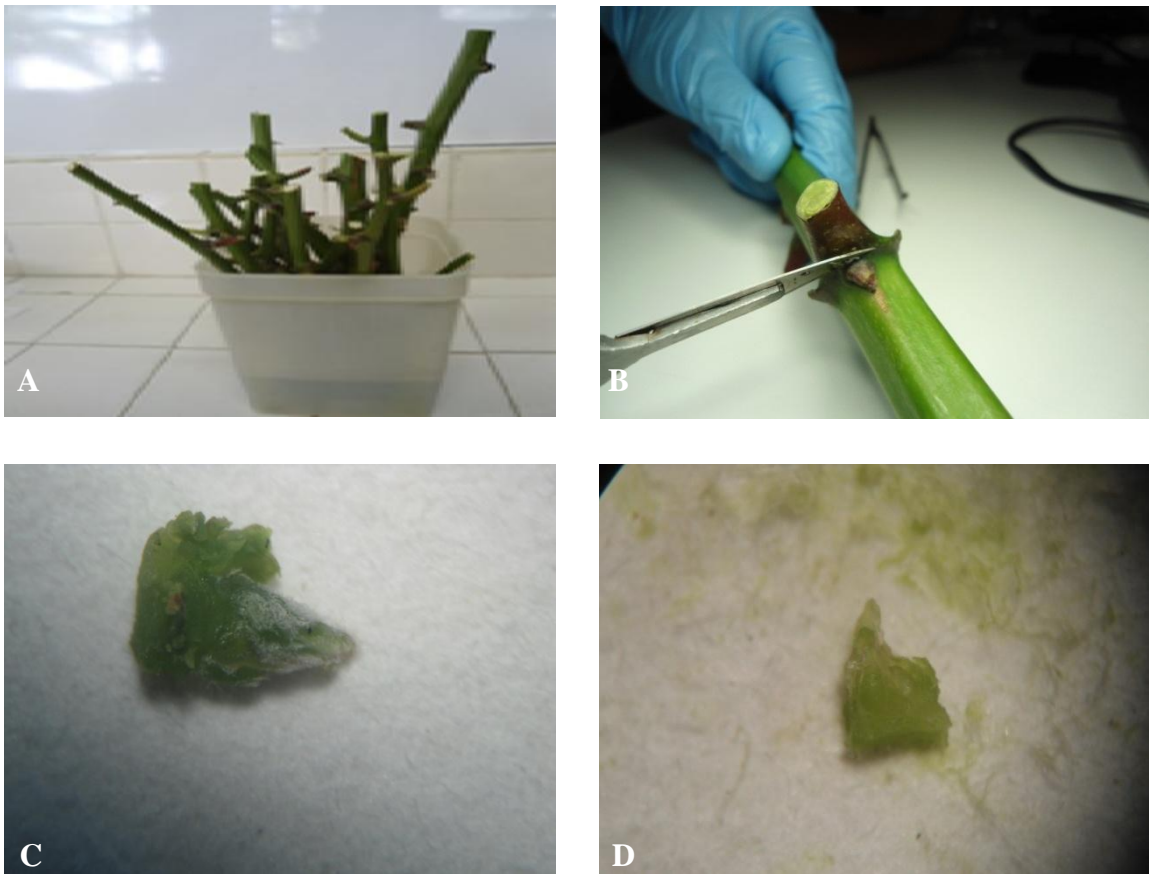


Figura 2. Preparación, desinfección y extracción de explantes de *Manihot esculenta* – variedad valencia-. A) Estacas colocadas en una solución de Benlate 2 g/L y Agri-mycin 2 g/L. B) Remoción de yemas axilares de las estacas. C) Yemas axilares sin estípulas. D) Domo meristemático utilizado para establecimiento *in vitro*.

Preparación del medio de cultivo. Se utilizó un medio de cultivo que tuviera las sales minerales de Murashige y Skoog (1962) al cual se le añadieron constituyentes orgánicos: 100 mg/L de inositol, 1 mg/L de tiamina HCL; los reguladores de crecimiento: 0.04 mg/L de 6-Bencil Aminopurina (BAP), 0.05 mg/L de Ácido Giberélico (AG) y 0.02 mg/L de Ácido Naftalenácetico (ANA). Además, se agregó 1.8 g/L de Phytigel (CIAT 1991) como agente gelatinizante (Cuadro 1). Para preparar las soluciones y medios de cultivo se usó agua destilada, para medir el pH se utilizó pH “Meter S20 Seven Easy™”, mientras que para ajustar el pH a 5.8 se utilizó HCL o KOH. Finalizado el medio se dispensó en frascos de vidrio colocando 10 ml por contenedor. Posteriormente el medio se esterilizó en autoclave “Market Forge Sterilmatic STM – E” a 15 PSI durante 20 minutos a una temperatura de 121 °C.

Cuadro 1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) modificado, utilizado en el establecimiento *in vitro* de domos meristemáticos de *Manihot esculenta* –variedad valencia-.

Componentes	Fórmula	Nombre Común	mg/L
Macroelementos	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	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
Microelementos	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	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 bihidratao	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
		6-Bencil Aminopurina (BAP)	0.040
		Ácido Giberelico (AG)	0.050
		Ácido Naftalenácetico (ANA)	0.020
		Sacarosa	20000.000
	Phytigel	1800.000	

Fuente: CIAT 1991.

Preparación, siembra y manejo del material vegetal. Antes de realizar la siembra se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol al 70%, los bisturíes y pinzas se esterilizaron a 250 °C en el esterilizador de calor seco Z3378550 – Steri 250, AC input

120V. El estereoscopio se desinfectó con alcohol al 70%, luego se separaron los primordios foliares de las yemas hasta llegar al domo meristemático. Los domos se sembraron uno en cada frasco, se sellaron los frascos y se colocaron en el cuarto de crecimiento a una temperatura de 22 °C, con un rango de humedad relativa de 70% a 80%. La intensidad de la luz es de 1800 Lux con un fotoperíodo de 16 horas luz procedente de lámparas fluorescentes del tipo “Silvanya Daylight Incandescent 75 W” y ocho horas de oscuridad

Después de 26 días del establecimiento *in vitro* se procedió a la realización de un experimento orientado a la búsqueda de producción de brotes. Los domos meristemáticos establecidos y que presentaban un microesqueje de aproximadamente 1 a 1.5 cm de altura, fueron colocados en tres medios diferentes para la producción de mayor número de brotes.

Producción de brotes. Se utilizó el regulador de crecimiento 6-Bencil Aminopurina (BAP) en las concentraciones de 0.04 mg/L y 0.5 mg/L y Sacarosa en las concentraciones de 20 g/L y 40 g/L. Estos fueron suplementados al medio de cultivo y combinados para obtener como resultado tres tratamientos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos para producción de brotes *in vitro* a partir de microesquejes obtenidos de domos meristemáticos de *Manihot esculenta* -variedad valencia-, en combinación de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y Sacarosa.

Tratamientos	BAP mg/L	Sacarosa g/L
Yt 0.04-20	0.04	20
Y1 0.50-20	0.50	20
Y2 0.50-40	0.50	40

Preparación, siembra de microesquejes y manejo de material vegetal. A nivel de la cámara de flujo laminar, se colocó un microesqueje por cada frasco con 20 ml de medio de cultivo que comprendían los tres tratamientos, posteriormente se sellaron los frascos y se procedió a colocarlos en el cuarto de crecimiento, a una temperatura de 22 °C, con un rango de humedad relativa de 70% a 80%, con 16 horas de luz y ocho horas de oscuridad, siendo la intensidad de la luz de 1800 Lux.

Datos evaluados del experimento de producción de brotes. Las variables evaluadas fueron sobrevivencia, contaminación, producción de brotes por tratamiento y cantidad de nudos por brote. Las variables sobrevivencia, contaminación y producción de brotes por tratamiento fueron evaluadas tres veces, a los 14 días, a los 24 días y a los 34 días. Cabe destacar que a los 24 días se realizó cambio a medio fresco. Mientras que la variable producción de nudos fue evaluada únicamente a los 34 días. La sobrevivencia de los microesquejes fue expresada en porcentaje, entendiendo como microesqueje muerto aquel que tenía una apariencia seca y coloración café y como microesqueje vivo aquel que

presentara una coloración verde. La determinación de la contaminación fue expresada en porcentaje; la determinación de los microesquejes con brotes y la determinación del número de nudos fueron expresados en forma numérica.

Diseño experimental. El diseño consistió en tres tratamientos y cada tratamiento tenía 27 repeticiones. Por lo tanto se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA). Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una separación de medias con el método Tukey con un nivel de significancia $P \leq 0.05$. Los datos fueron evaluados con el programa “Statistical Analysis System” (SAS versión 9.1[®])

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La asepsia de explantes de yuca –variedad valencia- únicamente se logró cuando se utilizaron domos meristemáticos para el establecimiento *in vitro* (Figura 3), ya que cuando se utilizaban yemas axilares estas se contaminaban en un 78% por hongos y bacterias, permitiendo únicamente 22% de yemas asépticas. Los domos meristemáticos lograron mantenerse asépticos en un 82.95% permitiendo el desarrollo adecuado de microesquejes.

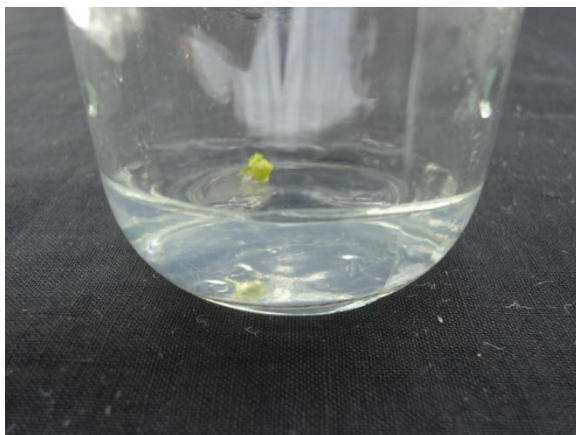


Figura 3. Domo meristemático aséptico de *Manihot esculenta* –variedad valencia-.

Al inicio del experimento los domos presentaban un microesqueje con un tamaño aproximado de 1 a 1.5 centímetros de altura (Figura 4). Después de 14 días de haber colocado los domos en tres tratamientos se observó crecimiento del microesqueje principal, siendo los microesquejes que se encontraban en el tratamiento Y2 0.50-40 los que presentaron un mayor crecimiento vegetativo (Figura 5), esto debido a que este tratamiento contenía mayor cantidad de sacarosa, lo cual permitió desarrollo de los microesquejes. Resultados similares se obtuvieron por Rayas *et al.* (2002) cuando realizó variantes en las concentraciones de sacarosa en el medio de cultivo MS, ya que a medida que aumentaba las concentraciones de sacarosa el desarrollo de las plántulas aumentaba, siendo el medio que mayor crecimiento de plántulas le dio el que contenía 40 g/L de sacarosa.

Es importante resaltar que uno de los microesquejes que se encontraban en el tratamiento Yt 0.04-20 inició con la formación de raíces (Figura 6), debido a que este tratamiento contenía una concentración de BAP menor a 0.5 mg/L. Esto concuerda con los resultados

de Marín *et al.* (2009) que utilizó microestacas de una yema, para la regeneración *in vitro* y observó que el desarrollo de raíces se ve limitado por concentraciones elevadas de BAP.



Figura 4. Microesquejes desarrollados a partir de domos meristemáticos con microesqueje de *Manihot esculenta* –variedad valencia- al inicio de los tratamientos de producción de brotes. A) Microesqueje en tratamiento Yt 0.04-20. B) Microesqueje en tratamiento Y1 0.50-20. C) Microesqueje en tratamiento Y2 0.50-40.

Así mismo se observó la emergencia de brotes en los tres tratamientos. Siendo el tratamiento Y2 0.50-40 el que mayor número de brotes generó (Figura 5), estos resultados difieren con los de Marín *et. al* (2009), en los cuales observó que concentraciones de BAP iguales o mayores a 0.5 mg/L disminuían la producción de brotes.



Figura 5. Microesquejes de *Manihot esculenta* –variedad valencia- a los 14 días de haberse implementado los tratamientos de producción de brotes. A) Tratamiento Yt 0.04-20. B) Tratamiento Y1 0.50-20. C) Tratamiento Y2 0.50-40.



Figura 6. Microesqueje de *M. esculenta* –variedad valencia- con formación de raíces.

Los tratamientos Yt 0.04-20 y Y1 0.50-20 generaron cantidades menores de brotes (Cuadro 3). La presencia de Ácido Giberélico (AG) y Ácido Naftalenácetico (ANA) combinados con altas concentraciones de sacarosa influyen positivamente en la producción de brotes múltiples.

Cuadro 3. Efecto de las concentraciones de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y Sacarosa, en la producción de brotes de *Manihot esculenta* –variedad valencia- a los 14 días de haberse implementado el tratamiento.

Tratamientos	BAP mg/L	Sacarosa g/L	Cantidad de brotes
Yt 0.04-20	0.04	20	1.26 ^{b‡}
Y1 0.50-20	0.50	20	1.26 ^b
Y2 0.50-40	0.50	40	2.04 ^a

‡ Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes, según la prueba Tukey con una $P \leq 0.05$.

Con respecto a la sobrevivencia de los tratamientos va de 81.48% a 88.89%, la mortalidad de 11.11% a 18.52%, la contaminación por hongos de 0.00% a 3.70% y la contaminación por bacterias en cada tratamiento es de 3.70%. Se debe tomar en cuenta que cuando se realiza propagación *in vitro* la técnica del propagador influye en la sobrevivencia y contaminación de los explantes, pero no el tratamiento *per se*.

Al finalizar los 24 días se evaluó nuevamente el crecimiento vegetativo en los microesquejes. Se observó mayor producción de brotes en los tres tratamientos (Figura 7) debido a que todos los tratamientos contenían Ácido Giberélico (AG) y Ácido Naftalenácetico (ANA) los cuales facilitan el desarrollo de brotes en concordancia con Marín *et al.* (2009), quien utilizó un medio con ANA 0,02 mg/L + AG₃ 0,05 mg/L + BA 0,5 mg/L.



Figura 7. Microesquejes de *Manihot esculenta* –variedad valencia- a los 24 días de haberse implementado los tratamientos de producción de brotes. A) Tratamiento Yt 0.04-20. B) Tratamiento Y1 0.50-20. C) Tratamiento Y2 0.50-40.

El tratamiento Y2 0.50-40 fue el que produjo más brotes (Cuadro 4). Sin embargo, el tratamiento Y1 0.50-20 no es significativamente diferente al tratamiento Y2 0.50-40 ni al tratamiento Yt 0.04-20.

Se pudo observar mayor cantidad de brotes con desarrollo de raíces en el tratamiento Yt 0.04-20 y un microesqueje con desarrollo de raíces en el tratamiento Y2 0.50-40. El desarrollo de raíces en el microesqueje Y2 0.50-40 pudo deberse al desarrollo que generan las altas concentraciones de sacarosa, resultados parecidos obtuvo Rayas *et. al* (2002), ya que al aumentar las concentraciones de sacarosa en el medio MS, obtuvo mayor altura, número de raíces y hojas.

Cuadro 4. Efecto de las concentraciones de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y Sacarosa, en la producción de brotes de *Manihot esculenta* –variedad valencia- a los 24 días de haberse implementado el tratamiento.

Tratamientos	BAP mg/L	Sacarosa g/L	Cantidad de brotes
Yt 0.04-20	0.04	20	1.26 ^b
Y1 0.50-20	0.50	20	1.48 ^{ab}
Y2 0.50-40	0.50	40	2.30 ^a

^{ab}Los tratamientos con distinta letra son significativamente diferentes, mientras que los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba Tukey con una $P \leq 0.05$.

Al finalizar los 34 días se observó una producción de brotes (Figura 8) similar en los tres tratamientos (Cuadro 5), por lo que se comprende que las concentraciones altas de sacarosa y BAP permiten una producción precoz de brotes.



Figura 8. Microesquejes de *Manihot esculenta* –variedad valencia- a los 34 días de haberse implementado los tratamientos de producción de brotes. A) Tratamiento Yt 0.04-20. B) Tratamiento Y1 0.50-20. C) Tratamiento Y2 0.50-40.

Cuadro 5. Efecto de las concentraciones de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y Sacarosa, en la producción de brotes de *Manihot esculenta* –variedad valencia- a los 34 días de haberse implementado el tratamiento.

Tratamientos	BAP mg/L	Sacarosa g/L	Cantidad de brotes
Yt 0.04-20	0.04	20	1.56 ^{ab}
Y1 0.50-20	0.50	20	1.96 ^a
Y2 0.50-40	0.50	40	2.30 ^a

^{ab}Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes, según la prueba Tukey con una $P \leq 0.05$.

Así mismo se evaluó la cantidad de nudos por microesqueje, siendo los microesquejes que se encontraban en el tratamiento Y2 0.50-40 los que presentaron mayor cantidad (Cuadro 6), dichos resultados concuerdan de cierta forma con los de Marín *et al.* (2009) ya que con el medio suplementado con ANA 0,02 mg/L + AG₃ 0,05 mg/L obtuvo la mayor cantidad de nudos. Dichos reguladores de crecimiento también se encontraban en cada uno de los tratamientos que se probaron en este estudio, pero no produjeron nudos en cantidades similares en los distintos tratamientos.

Estos resultados difieren a lo expresado por Marín *et al.* (2009), ya que según sus estudios el BAP en una concentración de 0.5 mg/L inhibe el desarrollo foliar y la producción de brotes y raíces. Es importante destacar que durante esta evaluación se observó una elevada producción de callos en el tratamiento Y1 0.50-20 (Figura 9) lo cual se atribuye según Marín *et al.* (2009) a la presencia de BAP en el medio de cultivo. Al mismo tiempo que se observó mayor producción de raíces en los tratamientos Yt 0.04-20 y Y2 0.50-40.

Cuadro 6. Efecto de las concentraciones de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y Sacarosa, en la producción de nudos por microesqueje de *Manihot esculenta* –variedad valencia- a los 34 días de haberse implementado el tratamiento.

Tratamientos	BAP mg/L	Sacarosa g/L	Nudos
Yt 0.04-20	0.04	20	1.56 ^{ab}
Y1 0.50-20	0.50	20	0.44 ^b
Y2 0.50-40	0.50	40	2.59 ^a

^{ab}Los tratamientos con distinta en letra son significativamente diferentes, según la prueba Tukey con una $P \leq 0.05$.

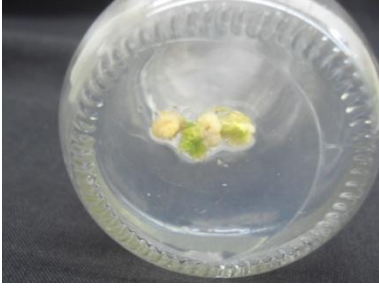


Figura 9. Formación de callos de *Manihot esculenta* –variedad valencia- en el tratamiento Y1 0.50-20

4. CONCLUSIONES

- El mejor método para el establecimiento *in vitro* de *Manihot esculenta* C. es utilizando como explantes domos meristemáticos, ya que esto permite mejor eficiencia del tratamiento de desinfección, evitando la contaminación por hongos y por bacterias.
- El tratamiento con 0.5 mg/L de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y 40 g/L de Sacarosa, es el que genera una producción precoz de brotes y a su vez genera mayor producción de nudos por microesqueje.

5. RECOMENDACIONES

- Para la producción de microesquejes de *Manihot esculenta* C. se recomienda utilizar 0.5 mg/L de 6-Bencil Aminopurina (BAP) y 40 g/L de Sacarosa.
- Continuar con la investigación para lograr el desarrollo radicular de los microesquejes y su posterior aclimatación para poder sembrarlos en campo.
- Realizar ensayos de producción de microesquejes aumentando las concentraciones de Ácido Giberélico y Ácido Naftalenácetico (ANA).

6. LITERATURA CITADA

Ceballos, H. 2002. La yuca en Colombia y el mundo: Nuevas Perspectivas para un Cultivo Milenario. *In:* B. Ospina y H. Ceballos (ed) La Yuca en el Tercer Milenio, Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p 1-13.

Ceballos, H. y G. A. de la Cruz. 2002. Taxonomía y Morfología de la Yuca. *In:* B. Ospina y H. Ceballos (ed) La Yuca en el Tercer Milenio, Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p 17-33.

FAO. 2000. La economía mundial de la yuca: hechos, tendencias y perspectivas. Roma, Italia. p 60.

Fintrac CDA. 2002. Programa de Producción y Comercialización de Yuca Valencia (en línea). Consultado 7 de octubre de 2012. Disponible en: http://www.fintrac.com/docs/honduras/success_yuca_esp_06_02.pdf

López, J. 2002. Semilla Vegetativa de Yuca. *In:* B. Ospina y H. Ceballos (ed) La Yuca en el Tercer Milenio, Sistemas Modernos de Producción, Procesamiento, Utilización y Comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p 49-75.

Marín, A., J. G. Albarrán, F. Fuenmayor y D. Perdomo. 2009. Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración *in vitro* de cinco cultivares élites de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). UDO Agrícola 9 (3):556-562.

Rayas, A., V. Mederos, M. García, J. López, M. Cabrera, J. Ventura, M. Martínez, V. Gutiérrez, M. Álvarez y M. Bauta. 2002. Estudio de medios de cultivo para la conservación *in vitro* de la yuca. Biotecnología Vegetal 2(4):249-251.

Roca, W. M. y L. A. Mroginski. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p 969.

Roca, W. M., B. Nolt, G. Mafla, J. Roa y R. Reyes. 1991. Eliminación de virus y propagación de clones en la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). *In:* Aplicaciones de Cultivo

de Tejidos a Especies Vegetales Económicamente Importantes. Unidad de investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia. p 404-420.

SAS. 2009. SAS User guide. Statistical Analysis Institute Inc. Cary N.C.

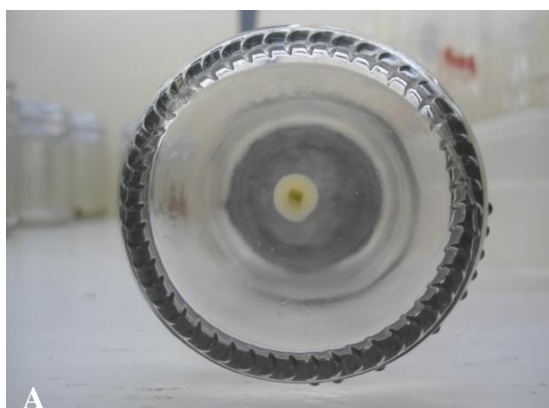
Sigma-Aldrich. TWEEN[®] 80 (en línea). Consultado 10 de septiembre de 2012. Disponible en:

http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/SigmaAldrich/Product_Information_Sheet/p8074pis.Par.0001.File.tmp/p8074pis.pdf

7. ANEXOS

Anexo 1. Contaminación por hongos y bacterias de yemas axilares utilizadas para el establecimiento *in vitro* de *Manihot esculenta* –variedad valencia-.

Explantes	Cantidad	(%)
Sembradas	50	100.00
Contaminadas con hongos y bacterias	39	78.00
Asépticas	11	22.00



Anexo 2. Contaminación de yemas axilares de *Manihot esculenta* –variedad valencia-. A) Contaminación por bacteria. B) Contaminación por hongo.

Anexo 3. Supervivencia, contaminación por hongos y bacterias de domos meristemáticos utilizados para el establecimiento *in vitro* de *Manihot esculenta* –variedad valencia-.

Explantes	Cantidad	(%)
Sembrados	88	100.00
Contaminados con hongos	9	10.23
Contaminados con bacterias	6	6.82
Asépticos	73	82.95

