

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**TRABAJO DE GRADO**

ESTABLECIMIENTO IN VITRO DE *Manihot esculenta* (YUCA) MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE AISLAMIENTO DE MERISTEMO, UTILIZANDO MEZCLA DE LOS  
FITORREGULADORES: 6-BENCILAMINOPURINA (6-BAP) Y ÁCIDO  
NAFTALENACÉTICO (ANA)

**PARA OPTAR AL GRADO DE**  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

**PRESENTADO POR**  
MARÍA DE LOS ÁNGELES ACOSTA VALLADARES

**DOCENTES ASESORES**  
MAESTRO RICARDO FIGUEROA CERNA  
LICENCIADA E INGENIERA NELLY RUTH GUERRERO DE MENÉNDEZ

**MAYO, 2019**

SANTA ANA, EL SALVADOR, CENTROAMÉRICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

AUTORIDADES



M. Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO  
RECTOR

DR. MANUEL DE JESÚS JOYA ÁBREGO  
VICERRECTOR ACADÉMICO

ING. NELSON BERNABÉ GRANADOS ALVARADO  
VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

LICDO. CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ  
SECRETARIO GENERAL

M. Sc. CLAUDIA MARÍA MELGAR DE ZAMBRANA  
DEFENSORA DE LOS DERECHOS UNIVERSITARIOS

LICDO. RAFAEL HUMBERTO PEÑA MARIN  
FISCAL GENERAL

FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE  
AUTORIDADES



DR. RAÚL ERNESTO AZCÚNAGA LÓPEZ  
DECANO

M. Ed. ROBERTO CARLOS SIGÜENZA CAMPOS  
VICEDECANO

M. Sc. DAVID ALFONSO MATA ALDANA  
SECRETARIO

LICDO. CARLOS MAURICIO LINARES HERNÁNDEZ  
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

## **Dedicatoria**

A:

**Dios**, por darme la salud para lograr mis objetivos y permitirme llegar hasta este punto, por iluminar mi mente y haber puesto a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía en esta etapa.

Mis padres, **Mauricio Ramichal Acosta Caballero y Flor de María Valladares de Acosta**, por haberme apoyado, aconsejado y motivado a dar lo mejor de mí siempre, por ser mis ejemplos de perseverancia; pero más que nada, por su amor incondicional.

**Mis familiares**, por darme su ejemplo y enseñarme a superar los momentos difíciles y por siempre creer en mí.

## Agradecimientos

A:

Los docentes de la Universidad de El Salvador, Facultad multidisciplinaria de Occidente, Departamento de Biología, por haber brindado sus conocimientos a lo largo de mi preparación como profesional, de manera especial al **Master Ricardo Figueroa Cerna**, asesor de mi proyecto de investigación, quien me ha guiado con paciencia y rectitud.

Mi asesora externa **Licenciada e Ingeniera Nelly Ruth Guerrero de Menéndez**, por confiar en mí, abrirme las puertas y permitirme realizar todo el proceso investigativo dentro del Departamento de Biotecnología-Laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónez” (ENA).

Todo el personal del Departamento de Biotecnología de la ENA, **Ingeniera Claudia Isabel Morales, Elmer Antonio Alvarenga, Blanca Elizabeth Sorto, Yuri Beatriz Mercado y José Eduardo Mendoza**, por brindarme sus valiosos conocimientos, ayudarme a crecer como profesional y como persona, por su paciencia, dedicación, apoyo y amistad.

Al **Ingeniero Luis Felipe Barahona González**, por guiarme en el inicio de esta fase y facilitarme conocimientos básicos para llevar a cabo este estudio.

**Ingeniero Jaime Ayala**, Jefe del departamento de socio economía y biometría del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA), por su colaboración, dirección y conocimientos, para lograr desarrollar esta investigación.

**Mi mejor amiga Eloísa Lissette Sandoval Gutiérrez**, quien me brindo su apoyo incondicional, por facilitarme los caminos para seguir adelante durante este proceso, sin pedir nada a cambio; por no dudar de mi capacidad y siempre alentarme cuando se presentaba una dificultad.

## Resumen

La especie *Manihot esculenta* (yuca) es considerada la cuarta fuente de carbohidratos y calorías más importante de las regiones tropicales, debido a que en sus raíces se almacena almidón, que es empleado para la alimentación humana y animal en países subdesarrollados. Esta planta se ha propagado de forma séptica por medio de estacas, por lo tanto se busca el cultivo *in vitro* para propagarla, asegurando la estabilidad genética y sanidad vegetal. El objetivo de la investigación fue el establecimiento *in vitro* de *Manihot esculenta* evaluando diferentes dosis de dos fitorreguladores: 6-Benzilaminopurina (6-BAP) y Acido naftalenacético (ANA), para determinar las que presentaran mejores efectos en la formación de nudos, altura y menor mortalidad. Además se sembraron meristemos de “yuca” en medios de cultivo, con sales minerales descritas por Murashige y Skoog (MS), suplementado con sacarosa, sustancias orgánicas, fitohormonas y carbón activado. Los tratamientos a evaluar fueron: el testigo (sin fitorreguladores), un tratamiento suplementado con 6-BAP (0.20 mg/L) y ANA (0.025 mg/L) y otro suplementado con 6-BAP (0.50 mg/L) y ANA (0.050 mg/L). El número de nudos fue mayor con 6-BAP (0.20 mg/L) + ANA (0.025 mg/L) produciendo un promedio de 2.60 nudos por explante. De igual manera, se obtuvieron explantes de mayor altura en los tratamientos que contenían BAP y ANA. Se formuló un protocolo con el que se obtuvieron los mejores resultados para el establecimiento de “yuca” utilizando la técnica de Aislamiento de meristemo.

## Índice

|   | Página |
|---|--------|
| 1. Introducción.....  | xi     |
| 2. Revisión de literatura.....  | 12     |
| 2.1 Generalidades del cultivo.....  | 12     |
| 2.1.1 Origen y distribución.....  | 12     |
| 2.1.2 Clasificación taxonómica.....   | 12     |
| 2.1.3 Descripción botánica de la “yuca”.....                                  | 13     |
| 2.1.4 Plagas y enfermedades.....  | 17     |
| 2.1.5 Importancia ecológica, social y económica del cultivo.....              | 20     |
| 2.1.6 Valor nutricional de <i>Manihot esculenta</i> .....                     | 23     |
| 2.2 Cultivo de “yuca” en El Salvador.....                                     | 25     |
| 2.3 Vías de propagación de la “yuca”.....                                     | 25     |
| 2.3.1 Propagación sexual.....   | 25     |
| 2.3.2 Propagación asexual.....  | 26     |
| 2.4 Cultivo de tejidos vegetales (CTV).....                                   | 27     |
| 2.4.1 Etapas del cultivo de Tejidos Vegetales.....                            | 28     |
| 2.4.2 Medios de cultivo.....  | 29     |
| 2.4.3 Técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV).....                     | 33     |
| 2.5 Antecedentes de cultivo <i>in vitro</i> de <i>Manihot esculenta</i> ..... | 36     |
| 3. Metodología.....   | 38     |
| 3.1 Enfoque, Alcance y Diseño de la investigación.....                        | 38     |
| 3.2 Descripción del área de estudio.....                                      | 38     |
| 3.3 Universo, población y muestra.....  | 38     |
| 3.3.1 Universo.....   | 38     |
| 3.3.2 Población.....  | 38     |
| 3.3.3 Muestra.....  | 38     |
| 3.4 Recolección de datos.....   | 39     |
| 3.4.1 Fase de campo.....  | 39     |
| 3.4.2 Fase de Laboratorio.....  | 40     |

|   |    |
|---|----|
| 3.5 Procesamiento y tabulación de datos .....   | 44 |
| 3.6 Análisis de los datos .....   | 45 |
| 4. Resultados.....  | 46 |
| 4.1 Altura de los explantes de <i>Manihot esculenta</i> .....   | 46 |
| 4.2 Formación de nudos por explante de <i>Manihot esculenta</i> .....   | 48 |
| 4.3 Mortalidad de explantes de <i>Manihot esculenta</i> .....   | 50 |
| 4.4 Protocolo para Establecimiento de <i>Manihot esculenta</i> (yuca) mediante la técnica de Aislamiento de meristemo ..... | 51 |
| 5. Discusión .....  | 54 |
| 5.1 Altura de los explantes de <i>Manihot esculenta</i> : .....   | 54 |
| 5.2 Formación de nudos por explante de <i>Manihot esculenta</i> : .....   | 55 |
| 5.3 Mortalidad de explantes de <i>Manihot esculenta</i> : .....   | 55 |
| 5.4 Protocolo.....  | 56 |
| 6. Conclusiones.....  | 57 |
| 7. Recomendaciones .....  | 58 |
| 8. Literatura citada.....   | 59 |
| Anexos .....  | 63 |

## Índice de tablas

|  | Página |
|--|--------|
| Tabla 1 Indicadores del cultivo de <i>Manihot esculenta</i> (yuca) en la población mundial en el año 2006 .....  | 22     |
| Tabla 2 Producción de <i>Manihot esculenta</i> (yuca) en el siglo actual .....   | 22     |
| Tabla 3 La raíz de la “yuca” presenta las siguientes propiedades nutritivas .....  | 23     |
| Tabla 4 Comparativo de aminoácidos esenciales en g/100g de proteína en base seca .....   | 24     |
| Tabla 5 Distribución de la siembra seriada en fase de Establecimiento de <i>Manihot esculenta</i> .....  | 39     |
| Tabla 6 Tratamientos con sus respectivas dosis de fitorreguladores y unidades experimentales para el establecimiento de <i>Manihot esculenta</i> .....               | 40     |
| Tabla 7 Componentes de las sales MS .....  | 41     |
| Tabla 8 Componentes del medio de cultivo con sus respectivas dosis para Establecimiento in vitro de <i>Manihot esculenta</i> .....                                   | 42     |
| Tabla 9 Análisis de varianza para la altura de explantes por tratamiento in vitro de <i>Manihot esculenta</i> en la fase de Establecimiento .....                    | 47     |
| Tabla 10 Prueba de Tukey para la altura de explantes por tratamiento in vitro de <i>Manihot esculenta</i> en la fase de Establecimiento .....                        | 47     |
| Tabla 11 Análisis de varianza para la formación de nudos de los explantes por tratamiento in vitro de <i>Manihot esculenta</i> , en la fase de Establecimiento ..... | 49     |
| Tabla 12 Prueba de Tukey para la formación de nudos de los explantes por tratamiento in vitro de <i>Manihot esculenta</i> en la fase de Establecimiento .....        | 49     |

## Índice de Figuras

|  | Página |
|--|--------|
| Figura 1. Componentes del sistema radical de <i>Manihot esculenta</i> (yuca) .....   | 14     |
| Figura 2. Tallo con los nudos y entrenudos de <i>Manihot esculenta</i> (yuca) .....  | 14     |
| Figura 3. Hojas de <i>Manihot esculenta</i> (yuca).....  | 15     |
| Figura 4. Flor masculina (derecha) y femenina (izquierda) de <i>Manihot esculenta</i> (yuca) .....   | 16     |
| Figura 5. Fruto de <i>Manihot esculenta</i> (yuca) .....   | 17     |
| Figura 6. Semillas de <i>Manihot esculenta</i> (yuca) .....  | 17     |
| Figura 7. Zonas productoras de “yuca” en El Salvador.....  | 25     |
| Figura 8. Estacas de <i>Manihot esculenta</i> (yuca) .....   | 26     |
| Figura 9. Explante de <i>Manihot esculenta</i> (yuca).....   | 27     |
| Figura 10. Etapas del Cultivo de Tejidos Vegetales.....  | 28     |
| Figura 11. Partes de la zona meristemática .....   | 35     |
| Figura 12. Promedio de altura de explantes de <i>Manihot esculenta</i> (yuca),.....<br>en medios de cultivo suplementados con diferentes dosis de 6-Benzilaminopurina y Acido Naftalenacético              | 46     |
| Figura 13. Promedio de número de nudos por explante de <i>Manihot esculenta</i> .....<br>(yuca), en medios de cultivo suplementados con diferentes dosis de 6-Benzilaminopurina y Acido Naftalenacético    | 48     |
| Figura 14. Porcentaje de mortalidad de explantes de <i>Manihot esculenta</i> (yuca), .....<br>en medio de cultivo suplementado con 0.20 mg/L de 6-Benzilaminopurina y 0.0 25 mg/L de Ácido Naftalenacético | 50     |
| Figura 15. Porcentaje de mortalidad de explantes de <i>Manihot esculenta</i> (yuca), .....<br>en medio de cultivo suplementado con 0.50 mg/L de 6-Benzilaminopurina y 0.050 mg/L de Ácido Naftalenacético  | 50     |
| Figura 16. Porcentaje de mortalidad de explantes de <i>Manihot esculenta</i> (yuca), .....<br>en medio de cultivo sin fitoreguladores  | 51     |

## 1. Introducción

La “yuca” es uno de los cultivos más importantes en el área alimenticia, puesto que es considerada la cuarta fuente de carbohidratos y calorías más importante de las regiones tropicales. Su producción en El Salvador surge como una buena alternativa para los productores, debido a que genera rendimientos altos y se adapta a las condiciones climáticas, además de que su demanda aumenta en el mercado local e internacional. En el país la “yuca” se ha propagado mediante la vía asexual por estacas, siendo una de las limitantes los problemas fitosanitarios y la tasa de multiplicación baja, por esta razón se han buscado otras alternativas para la extensión del cultivo de *Manihot esculenta* (yuca), que aseguren el saneamiento vegetal y permitan el intercambio internacional de germoplasma, una de estas alternativas es la técnica *in vitro* por la vía de Aislamiento de meristemo.

La investigación se centró en el establecimiento *in vitro* de *Manihot esculenta* (yuca), a partir de la extracción de meristemas que fueron sembrados en un medio de cultivo, adicionando fitorreguladores en diferentes dosis, conteniendo las sales minerales MS, del protocolo del Departamento de Biotecnología-Laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales de la Escuela Nacional de Agricultura “Roberto Quiñónez” (ENA).

La respuesta a evaluar fue considerada bajo las siguientes variables: Mortalidad de explantes, altura del explante y formación de nudos por explante, hipotetizando que en la etapa de establecimiento, existe diferencia estadísticamente significativa o no en cuanto a desarrollo del explante, en relación a las diferentes dosis de fitorreguladores. Se formuló un protocolo a partir de la respuesta favorable de la investigación, con el cual se contribuye a asegurar la pureza varietal, el saneamiento vegetal y la producción masiva del cultivo de “yuca”.

## 2. Revisión de literatura

### 2.1 Generalidades del cultivo

#### 2.1.1 Origen y distribución

La más antigua y hasta ahora más sostenida hipótesis del origen de la “yuca”, se atribuye al botánico y geógrafo de plantas De Candolle, en 1967, quien basado en la abundancia de especies silvestres en la parte noroeste del Brasil y evidencias que muestran la antigüedad del cultivo de la “yuca” en dicha región, propuso que ésta fue meramente cultivada allí. También se considera que la “yuca” fue cultivada por primera vez en Brasil, Venezuela o Centro América. Numerosas evidencias apuntan a que el área de domesticación de la “yuca” comprende una vasta región desde México hasta Brasil (Suárez L. & Mederos V., 2011).

La “yuca”, es una planta originaria de América del Sur y fue domesticada hace unos 5000 años y cultivada extensivamente, desde entonces, en zonas tropicales y subtropicales del continente. No existe un registro documentado sobre la presencia de poblaciones silvestres de la planta antes de esa fecha (Nicaragua K., *et al.* 2004)

En la cuenca amazónica es donde el género botánico al que pertenece la “yuca” muestra su mayor variabilidad genética. También se observa en Mesoamérica un centro secundario de diversidad genética (Ceballos H., & De la Cruz G., 2002)

La “yuca” se encuentra distribuida desde el suroeste de estados unidos (33°N) hasta argentina (33°S). Naturalmente, solo se encuentran especies del género *Manihot* en las Américas. (Ceballos H., & De la Cruz G., 2002)

#### 2.1.2 Clasificación taxonómica.

El nombre científico de *Manihot esculenta* (yuca) fue dado originalmente por Crantz (C.), en 1766. (Ceballos H., & De la Cruz G., 2002)

Según Ruggiero M., Gordon D., Bailly N., Kirk P., Nicolson D. (2011) *Manihot esculenta* (yuca) se clasifica taxonómicamente así:

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Género: *Manihot*

Especie: *Manihot esculenta*

### 2.1.3 Descripción botánica de la “yuca”.

*Manihot esculenta* (yuca) y el resto de especies de Euphorbiaceae se caracterizan por su notable desarrollo de los vasos laticíferos, compuestos por células secretoras llamadas galactocitos. Esto es lo que produce la secreción lechosa que caracteriza a las plantas de esta familia (Ceballos H., & De la Cruz G., 2002).

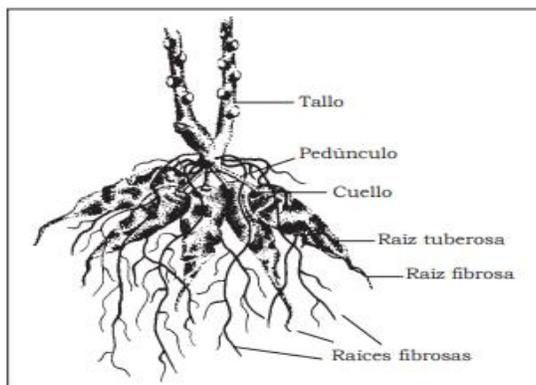
Existe una gran variabilidad de arquitecturas de la planta dentro de esta familia, desde los tipos arbóreos (caucho, *Hevea brasiliensis*) hasta los arbustos, también de importancia económica (ricino, *ricinus comunis*) (Ceballos H., & De la Cruz G., 2002).

Ceballos H., & De la Cruz G. (2002) explica que:

*Raíz:* La principal característica de las raíces de “yuca” es su capacidad de almacenamiento de almidones, razón por la cual es el órgano de la planta que hasta el momento ha tenido un mayor valor económico. Sin embargo, no todas las raíces producidas eventualmente se convierten en órganos de almacenamiento. (p.24)

El sistema radical presenta una baja densidad de raíces, pero una penetración profunda. Esta es una característica muy relevante, pues contribuye a que la planta tenga la capacidad de soportar periodos prolongados de sequía. Las raíces fibrosas de la “yuca” pueden alcanzar profundidades hasta de 2.5 m la planta absorbe el agua, y los nutrientes por medio de las raíces fibrosas, capacidad que pierden cuando se transforman en tuberosas. (p.25)

En un principio morfológico y anatómicamente no existe diferencia entre las raíces fibrosas y las tuberosas. La diferencia radica en que en el momento en que se inicia la acumulación de almidones, el sentido del crecimiento de la raíz cambia de longitudinal a radial. Sin embargo, esto no implica necesariamente que la raíz detenga su crecimiento longitudinal de manera absoluta. (p.25) (ver figura 1).



*Figura 1.* Componentes del sistema radical de *Manihot esculenta* (yuca) Recuperado de “*La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización, Capítulo 2*, de Ceballos, Hernán; De la Cruz A., (2002) p. 25

Ceballos H., & De la Cruz G. (2002) afirma que:

*Tallo:* El tallo maduro es cilíndrico y su diámetro varía de 2 a 6 cm. Se pueden observar tres colores básicos de tallo maduro: gris-plateado, morado y amarillo verdoso. Tanto el diámetro como el color de los tallos varía significativamente con la edad de la planta y, obviamente, con la variedad. Los tallos están formados por la alternación de nudos y entre nudos (p.17); (ver figura 2).

Ceballos H., & De la Cruz G. (2002) resume que “en el nudo se insertan el peciolo de la hoja, una yema axilar protegida por una escama y dos estipulas laterales”. (p.17)



*Figura 2.* Tallo con los nudos y entrenudos de *Manihot esculenta* (yuca)

*Hojas:* Las hojas son caducas. El número total de hojas producidas por la planta, su longevidad y capacidad fotosintética son características varietales, profundamente influidas por las condiciones ambientales (Ceballos H., & De la Cruz G., 2002)

Como se muestra en la figura 3, la “yuca” presenta hojas compuestas por la lámina foliar (hoja propiamente dicha, y consta de dos caras que son: el haz o cara superior y el envés o cara inferior) y el peciolo. La lamina foliar es palmeada y profundamente lobulada, según el cultivo la lámina foliar es de diferentes colores; morado, verde oscuro y verde claro, son los colores básicos. El peciolo puede tener una longitud de 9-20 cm, es delgado y de pigmentación variable (verde a morada) dependiendo de la variedad. La lamina foliar por lo general presenta un número de lóbulos impar, entre 3-9 de acuerdo a la variedad, sin embargo esto puede variar en hojas de la misma planta. Los lóbulos miden entre 4-20 cm de longitud y entre 1-6cm de ancho. Los lóbulos centrales son de mayor tamaño que los laterales Domínguez (citado de Giraldo A., 2006)

Según Ceballos H., De la Cruz G. (2002):

El color de las hojas también es una característica varietal, pero que puede variar con la edad de la planta. Las hojas maduras pueden ser desde púrpura, verde oscuro, hasta verde claro. El haz de la hoja está cubierta por una cutícula cerosa brillante, mientras que el envés es opaco y en él se encuentran localizados la mayoría de los estomas, aunque algunas variedades también presentan abundantes estomas en el haz. En el punto de inserción del peciolo al tallo se pueden observar dos estipulas de 0.5 a 1.0 cm de largo. Estas estipulas pueden o no permanecer adheridas al tallo una vez que la hoja se ha desarrollado completamente. (p.21)



Figura 3. Hojas de *Manihot esculenta* (yuca)

Según Ceballos H., De la Cruz G. (2002):

*Inflorescencia:* Como todas las del género *Manihot*, la “yuca” es una planta monoica, es decir, con flores unisexuales masculinas y femeninas en una misma planta y, generalmente, en la misma inflorescencia. Las flores de la “yuca” se producen en inflorescencias. La estructura básica del arreglo de las flores es el racimo, en el que las flores femeninas ocupan las posiciones basales y las masculinas las distales. Estas últimas son más pequeñas y generalmente más numerosas que las femeninas. Es frecuente que se produzcan también panículas que, desde el punto de vista botánico, pueden definirse como un racimo de racimos. En este caso existe un racimo principal, compuesto a su vez de racimos secundarios. (p.22) (ver figura 4)

Ceballos H., & De la Cruz G. (2002) explica que “cada flor, sea masculina o femenina, tiene una bráctea primaria y una bractéola”. (p.22)



Figura 4. Flor masculina (derecha) y femenina (izquierda) de *Manihot esculenta* (yuca) Recuperado de “La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización, Capítulo 2, de Ceballos, Hernán; De la Cruz A., (2002) p. 23

*Fruto:* Ceballos H., & De la Cruz G. (2002) dice que “el fruto es una cápsula dehiscente y trilobular, de forma ovoide a globular, de 1.0 a 1.5 cm de diámetro, con seis aristas longitudinales, estrechas y prominentes” (p.23); como se observa en la figura 5.



*Figura 5.* Fruto de *Manihot esculenta* (yuca) Recuperado de “*La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización, Capítulo 2*, de Ceballos, Hernán; De la Cruz A., (2002) p. 23

*Semilla:* Ceballos H., & De la Cruz G. (2002) define que “la semilla no es importante en reproducción y multiplicación habitual, pero tiene un incalculable valor para el fitomejoramiento”. (p. 24)

Ceballos H., & De la Cruz G. (2002) explica que “la semilla es de forma ovoide-elipsoidal y mide alrededor de 1 cm de largo, 6mm de ancho y 4mm de espesor. La testa es lisa, de color café, con moteado gris.” (p.24) (ver figura 6).



*Figura 6.* Semillas de *Manihot esculenta* (yuca) Recuperado de “*Manejo Integrado de Yuca (Manihot esculenta)*, de Carrión E., López A., Meneses E. & Moreno J. (2010) p. 2

#### **2.1.4 Plagas y enfermedades.**

##### **2.1.4.1 Plagas.**

Dentro de las plagas de la “yuca”, hay unas que están en gran número, estas son las menores, ocasionando pocas pérdidas en rendimiento o ninguna. Otras se clasifican como plagas mayores porque, al parecer, han coevolucionado con el cultivo y lo hacen su principal o único hospedero; estas plagas pueden causar daños severos al cultivo, que se manifiestan en pérdidas de rendimiento. Estas plagas mayores de la “yuca” son los ácaros, la “mosca blanca”,

los trips, el gusano cachón, el piojo harinoso, las chinches de encaje, la chinche subterránea o de la viruela de la “yuca”, y los barrenadores del tallo (Colombia Alternative Development (CAD, 2003))

Según CAD (2003):

Otras plagas, como las escamas, el saltahojas, la chisa blanca, el gusano trozador, la hormiga cortadora de hojas, la mosca de la fruta, la mosca del cogollo y los comejenes pueden ocasionar daños esporádicos o localizados al cultivo. Estas se consideran plagas menores o generalistas (p.6)

- *Barrenadores del tallo* En las estacas que se usan para plantación se han encontrado barrenadores del tallo, principalmente de los órdenes Lepidóptera y Coleóptera. La infestación ocurre, generalmente, cuando las plantas están en crecimiento y también durante el almacenamiento del material de siembra. Este debe inspeccionarse cuidadosamente antes de usarlo. Normalmente, estos insectos se detectan por la presencia de galerías y perforaciones en el tallo, acompañadas de exudados lechosos, aserrín (CAD, 2003)

- *Gusano cachón de la “yuca” (Erinnyis ello)*: Es una de las plagas más importantes de la “yuca” en el geotrópico. Tiene un amplio hábitat geográfico. Las larvas del gusano cachón se alimentan de hojas de “yuca” de todas las edades, de tallos tiernos y de brotes. Los ataques severos causan defoliación completa de calidad de ésta. Aunque la pérdida de rendimiento puede ser severa por la defoliación completa debida a uno o a varios ataques repetidos, la planta de “yuca” no muere (CAD, 2003)

- *Moscas blancas de la “yuca” (Aleurotrachelus sp., Bemisia tabaci)* Se alimentan directamente de la planta de la “yuca” y sirven de vectores de los virus que las atacan. Causan, por tanto, daños significativos a estos cultivos en los agroecosistemas de América. Se sabe que estas moscas blancas son transmisoras de virus que causan en la “yuca” las siguientes enfermedades: El Mosaico africano de la “yuca” (ACMD), que proviene de varios geminivirus transmitidos por *B. tabaci*. Y el cuero de sapo, que afecta la “yuca” en el geotrópico, tiene como vector a *B. tuberculata*. Las moscas blancas causan daño directo a las hojas mediante su actividad de alimentación, tanto los adultos como los estados inmaduros de *A. sp*, son activos y dañinos, se alimentan del floema y las hembras lo hacen aun durante la cópula y la oviposición. En general, las hojas se tornan amarillas, se necrosan y, finalmente, se

desprenden, según la intensidad del ataque, cubiertas por un crecimiento fungoso negro que se conoce como fumagina. (CAD, 2003).

-Trips (*Frankliniella sp.*, *Scyrtotrips sp.*, *Corynotrips sp.* y *Caliotrips sp.*) Los trips son una plaga de cuidado en América del Sur. Cuando atacan la planta, las hojas no se desarrollan normalmente; los folíolos se deforman y se presentan manchas amarillas cloróticas o desgarramientos pequeños e irregulares. Los puntos terminales de crecimiento pueden morir y esto induce el crecimiento de yemas laterales; éstas pueden también sufrir el ataque de la plaga, lo que le da la apariencia de una escoba de bruja y la deja enana. Este ataque es más frecuente durante los períodos secos y las plantas afectadas pueden recuperarse con la llegada de la época lluviosa (CAD, 2003)

#### **2.1.4.2 Enfermedades fungosas.**

La “yuca” es afectada por muchas enfermedades fungosas y bacterianas cuya distribución geográfica e importancia económica varían considerablemente. Las enfermedades que causan manchas foliares, necrosamiento del tallo y pudriciones radicales se presentan con mayor frecuencia y se distribuyen más ampliamente, causando pérdidas en rendimiento.

-Pudrición radical inducida por *Phytophthora spp.* CAD (2003) afirma que: “esta enfermedad se ha encontrado en África y América tropical, causando pérdidas en el rendimiento que llegan hasta el 80% de la producción total” (p.16)

Según CAD (2003):

El patógeno ataca las plantas jóvenes o maduras, especialmente cuando están cerca de zanjas de drenaje o de zonas mal drenadas, causando marchitez repentina en la planta y severa pudrición blanda en las raíces. Inicialmente las raíces jóvenes infectadas presentan manchas acuosas que se extienden y luego adquieren una coloración marrón. Las raíces infectadas frecuentemente exudan un líquido de olor repugnante y luego se deterioran completamente en el suelo. El hongo *Phytophthora* es un habitante natural del suelo, que puede afectar el cultivo en cualquier etapa; su desarrollo está favorecido por los suelos encharcados que se secan rápidamente o que tiene bajo contenido de nutrientes. (p.16)

El hongo puede hacer una invasión primera en la planta; después, a esta lesión llegan parásitos débiles o saprofitos que degradan los tejidos radicales y enmascaran así al agente primario que causa la enfermedad. (p.16)

#### **2.1.4.3 Enfermedades bacterianas.**

Añublo bacteriano (*Xanthomonas sp.*) CAD (2003) explica que: “el añublo bacteriano se considera una de las enfermedades más limitantes de la producción de “yuca” en áreas afectadas por él, ocasionando pérdidas hasta del 100%” (p.17).

Según CAD (2003):

La bacteria penetra al hospedero por los estomas y por heridas en la epidermis. Es sistémica y se mueve en los tallos y pecíolos a través de los vasos del xilema y posiblemente por el floema. Los síntomas característicos son manchas foliares que inicialmente son pequeñas y angulares y de apariencia acuosa en el envés; luego crecen cubriendo totalmente la hoja y adquieren un color marrón de añublo o quemazón foliar. Hay entonces marchitez, muerte descendente, exudación gomosa en los tallos jóvenes infectados, en los pecíolos y en las manchas foliares; además, los haces vasculares de los pecíolos y de los tallos infectados se necrosan, tomando la apariencia de bandas de color marrón o negro. (p.17)

#### **2.1.5 Importancia ecológica, social y económica del cultivo.**

Se considera que el cultivo de “yuca” es de gran importancia en suelos con ligeros problemas de compactación; dado que, después de varios ciclos de cultivos la capa superficial de suelos queda totalmente removida ayudando a la aireación y a la incorporación de la biomasa de árboles (CATIE & Instituto de Recursos Naturales Renovables (INRENARE), 1995)

Existen posibilidades de éxito de un cultivo, cuando en el sistema se incluyen combinaciones de un cultivo anual con leguminosas, árboles o arbustos leñosos, que son podados periódicamente, para evitar sombra y proveer abono verde al cultivo. La “yuca” se puede combinar con *Erythrina poeppigiana* y su importancia radica en los sistemas agroforestales, estos árboles aportan nitrógeno y otros nutrimentos que pueden ser traídos a la

superficie por absorción y posterior reciclaje de los residuos Kass (citado de CATIE & Instituto de Recursos Naturales Renovables (INRENARE), 1995)

La “yuca” es catalogada como la más importante dentro de este grupo de plantas de interés económico (raíces y tubérculos), tiene su principal valor económico en su órgano de reserva o almacenamiento de energía, las raíces, este tiene diversos usos en la alimentación humana y animal, aunque su follaje se aprovecha para alimentación animal en algunas zonas rurales y, en África, se utiliza como verdura fresca para consumo humano (Suárez L. & Mederos V., 2011)

El producto industrial más importante elaborado con base en “yuca” es el almidón, que se usa en las industrias alimenticia y textil y en la fabricación de papeles y adhesivos, aunque también tiene potencial en la producción de dextrosa y múltiples derivados, sin contar con su potencial para producir alcohol, como se ha hecho en Brasil para sustituir petróleo (Suárez L. & Mederos V., 2011)

Las propiedades de claridad y baja retrogradación del almidón de “yuca” hacen que se pueda utilizar en muchos productos alimenticios. Sus características orgánicas se asemejan bastante al almidón del maíz (Suárez L. & Mederos V., 2011)

La “yuca” constituye uno de los alimentos fundamentales, especialmente en aquellas zonas con déficit alimentario, gracias a su importante contenido proteico y energético (Sistema de Información del Sector Agropecuario Costarricense (InfoAgro) (s.f)).

Según InfoAgro (s.f) deduce que:

Como se muestra en la tabla 1, podemos observar como África es el continente con mayor producción mundial, alcanzando el 53,94% del total mundial, siendo Nigeria el mayor país productor con 45,7 millones de toneladas, que ya de por sí supera a la producción de América y Oceanía juntas. Asia produce el 29,6% de la “yuca” mundial, destacando Tailandia con 22,6 millones de toneladas, seguida de Indonesia con 19,9 millones. No obstante apreciamos como, a pesar de las cifras de producción de África, es Asia el continente que consigue un mayor rendimiento de sus plantaciones en kg/ha, quienes obtienen casi el doble de rendimiento al cultivo (18.243,15 frente a 10.081,02).

No es de extrañar que el país americano que más mandioca produce sea Brasil, con 26.713.038 de toneladas, representando el 72,16% de la producción americana. (párr. 4)

Tabla 1  
*Indicadores del cultivo de Manihot esculenta (yuca) en la población mundial en el año 2006*

|         | Producción-cantidad (tm) | Superficie cultivada (ha) | Rendimiento (kg/ha) |
|---------|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| América | 37.041.521,00            | 2.806.835,00              | 13.196,90           |
| África  | 122.088.128,00           | 12.110.694,00             | 10.081,02           |
| Asia    | 67.011.365,00            | 3.673.235,00              | 18.243,15           |
| Oceanía | 196.382,00               | 17.560,00                 | 11.183,49           |
| Total   | 226.337.396,00           | 18.608.324,00             | 52.726,27           |

*Nota.* Recuperado de “El cultivo de la yuca”, de Infoagro, (s.f) párr. 4

InfoAgro (s.f) explica que:

Sabíamos que la producción de “yuca” había ido aumentando progresivamente desde mediados del siglo pasado, se refleja cómo se mantiene esta tendencia en el siglo actual. Esto se debe entre otras cosas a que se trata de un cultivo que se adapta a suelos pobres o tierras marginales donde no se pueden producir otros cultivos y no requiere de muchos fertilizantes, plaguicidas o agua. Además, como la “yuca” puede recolectarse en cualquier momento de los 8 a los 24 meses después de ser plantada, puede permanecer en el terreno como defensa contra una escasez de alimentos inesperada. (párr.5) (ver tabla 2)

También gracias a los planes de acción llevados a cabo por la FAO para fomentar el cultivo de la “yuca”, y luchar contra el hambre en muchos países en desarrollo. Por ejemplo, Ghana logró reducir la desnutrición más rápidamente que cualquier otro país entre 1980 y 1996, aumentando la producción y el consumo de “yuca”. (párr.5)

Tabla 2  
*Producción de Manihot esculenta (yuca) en el siglo actual*

| Año             | 2000        | 2001        | 2002        | 2003        | 2004        | 2005        | 2006        |
|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Producción (tm) | 178.470.309 | 185.222.804 | 187.081.373 | 192.893.391 | 205.620.111 | 211.255.740 | 226.337.396 |

*Nota.* Recuperado de “El cultivo de la yuca”, de Infoagro, (s.f) párr. 5

Dado que la “yuca” es un cultivo que se adapta, a través de sus muchos derivados, a la mayor parte de los suelos y climas, representa el alimento básico de cierto porcentaje de la población. El desarrollo del cultivo de la “yuca” en grandes cantidades ha permitido mejorar la calidad de los productos locales derivados de la “yuca”. Esta participación de mercado de los agricultores ha contribuido a incrementar su nivel de ingresos. FAO (s.f)

Las plantas agroindustriales importan grandes cantidades de almidón, fundamentalmente elaborado a partir de “yuca” procesada. Estos productos derivados de la “yuca” pueden producirse a nivel local y podrían representar una fuente de ingreso para los habitantes de las comunidades productoras locales. Djilemo (citado de FAO (s.f)).

### **2.1.6 Valor nutricional de *Manihot esculenta*.**

La raíz de “yuca” presenta propiedades nutritivas que ofrecen una fuente muy buena de energía, carbohidratos, calcio, fósforo y ácido ascórbico (ver tabla 3).

Tabla 3

*La raíz de la “yuca” presenta las siguientes propiedades nutritivas*

| Composición nutritiva media (por 100g de base seca) |       |
|---|-------|
| Valor energético (kcal)                             | 132,0 |
| Agua (%)  | 65,2  |
| Proteína (%)  | 1,0   |
| Grasa (%)   | 0,4   |
| Carbohidratos totales (%)                           | 32,8, |
| Fibra (%)   | 1,0   |
| Cenizas (%)   | 0,6   |
| Calcio (mg)   | 40,0  |
| Fosforo (mg)  | 34,0  |
| Hierro (mg)   | 1,4   |
| Tiamina (mg)  | 0,05  |
| Riboflavina (mg)                                    | 0,04  |
| Niacina (mg)  | 0,60  |
| Ácido ascórbico (mg)                                | 19,00 |
| Porción no comestible (%)                           | 32,00 |

*Nota.* Recuperado de “Mandioca una opción industrial”, de Fretes F., (2010) p. 8

Además de la raíz, otra parte de la planta que presenta características nutricionales son las hojas, estas virtudes pueden ser revolucionarias en el mundo de la alimentación y la salud.

Su alto contenido nutricional dada la presencia de sus 18 aminoácidos esenciales, las convierte en un alimento mejor que la quinua, la kiwicha y la soya. Contiene minerales como hierro, calcio, potasio, fósforo, magnesio, cobre y zinc, que es uno de los más importantes en la alimentación humana; también alto contenido de beta carotenos y vitaminas A, B1, B2, B6, B12, Y C. Posee vitaminas como la niacina que es un depurativo y desintoxicante poderoso, el ácido fólico que es una poderosa vitamina anti anémica y el ácido pantoténico que evita el deterioro de los tejidos de la piel A&E (citado de Giraldo A., 2006).

Al comparar la “yuca” con leguminosas y cereales, se encuentran diferencias en los aminoácidos, como la alfalfa y la soya, como se observa en la tabla 4, hay diferencias en aminoácidos tales como glicina, histidina y en algunos muy importantes como la metionina y la leucina que las hojas de “yuca” superan marcadamente los contenidos de estos a la soya y la alfalfa.

Tabla 4  
*Comparativo de aminoácidos esenciales en g/100g de proteína en base seca*

| Nutrimento     | Follaje de yuca | Torta de soya | Alfalfa |
|----------------|-----------------|---------------|---------|
| Proteína cruda | 18.94           | 47.50         | 22.00   |
| Lisina         | 5.87            | 6.50          | 0.60    |
| Metionina      | 1.86            | 1.60          | 0.20    |
| Treonina       | 4.20            | 4.39          | n.r     |
| Triptófano     | 1.99            | n.r           | n.r     |
| Isoleucina     | 4.50            | 4.70          | 0.70    |
| Leucina        | 8.19            | 7.10          | 1.10    |
| Arginina       | 5.34            | 7.50          | 3.80    |
| Alanina        | 5.73            | 4.40          | n.r     |
| Histidina      | 2.30            | 2.80          | 1.20    |
| Valina         | 5.56            | 5.10          | 0.70    |
| Glisina        | 4.86            | 4.40          | 1.90    |

*Nota.* Recuperado de “Estudio de la obtención de harina de hojas de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) para consumo humano”, de Giraldo A. (2006) p.18

## 2.2 Cultivo de “yuca” en El Salvador

Actualmente en todo el territorio nacional el área cultivada de yuca es de 2,800 hectáreas aproximadamente y dicho cultivo es sembrado tradicionalmente por pequeños productores, en áreas que van desde 0.20 a 1.4 hectáreas. Las zonas donde se cultiva esta especie mayormente, es en el occidente del país, Chalatenango, La Libertad, La Paz, San Vicente, Usulután y San Miguel (Martínez, J. & Ramos A., 2012), como se observa en la figura 7.



Figura 7. Zonas productoras de “yuca” en El Salvador Recuperado de “*Estudio de factibilidad técnica y económica de hojas de yuca finamente triturada, como fortificante directo en la preparación de alimentos*”, de Martínez, J. & Ramos A., (2012) p. 13

## 2.3 Vías de propagación de la “yuca”

*Manihot esculenta* puede propagarse de forma sexual y asexual

### 2.3.1 Propagación sexual.

La “yuca” se puede propagar a partir de semilla sexual, pero tiene el inconveniente de segregación, porque esta especie es heterocigótica y alógama.

Ceballos H., & De la Cruz G. (2002) afirman que:

Debido a que la “yuca” tiene la posibilidad de una reproducción vegetativa, las disfunciones reproductivas no son, desde el punto de vista evolutivo, tan negativas como en los cultivos de reproducción exclusivamente sexual. Por lo tanto, es posible encontrar con frecuencia, por ejemplo, casos de androesterilidad que pueden ser de dos

tipos: cuando las flores abortan antes de alcanzar madurez o cuando las flores maduran pero las anteras no producen polen. (p.23)

La polinización de la “yuca” es cruzada, por lo que cada individuo es naturalmente un híbrido con altos niveles de heterociguidad. Esta es realizada típicamente por acción de los insectos. La autopolinización se ve desfavorecida por el hecho de que las flores femeninas de un racimo abren primero que las masculinas, fenómeno conocido como protoginia. Sin embargo, es posible, ocasionalmente, que flores masculinas y femeninas de distintos racimos, pero de una misma planta, abran de manera simultánea, y cuando ello sucede es posible la ocurrencia natural de autopolinizaciones. (p.22)

### 2.3.2 Propagación asexual.

También llamada propagación vegetativa, sirve para reproducir las características deseables de un árbol o arbusto seleccionado.

El método convencional utilizado es a partir de estacas del tallo; como se muestra en la figura 8. De acuerdo con la disponibilidad del material inicial y de los objetivos de la plantación, se pueden utilizar dos técnicas principales que son: la megapropagación y macropropagación: en la primera mencionada, se utiliza la parte intermedia del tallo de plantas maduras sin enfermedades y sin daño mecánico, para propagarla y el objetivo de la segunda propagación, es generar la máxima cantidad posible de estacas, a partir de una planta, mediante la estimulación de las yemas axilares del tallo y la producción de miniestacas, esta técnica es utilizada cuando hay poco material y poco tiempo para propagarlas (Aguilar E., 2017)

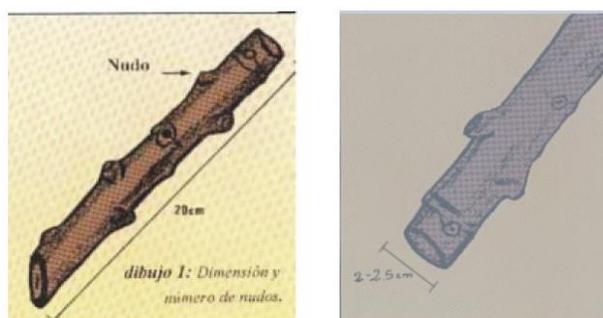


Figura 8. Estacas de *Manihot esculenta* (yuca) Recuperado de “*El Cultivo de mandioca, técnicas para elevar la producción*”, de Barbona S. (2011) párr. 9

Todas estas formas de propagación de la “yuca” dan lugar a plagas y enfermedades, al propagar plantas infectadas, lo que se está propagando son bacterias, virus y plagas. Por esta razón, se requiere la utilización de una técnica que no conlleve a este problema, la solución es mediante la extracción y siembra de meristemo, en un medio de cultivo *in vitro* estéril, en el cual ese tejido se desarrollará, hasta convertirse en un individuo, el meristemo es un tejido que se encuentra estéril, pues no presenta vasos conductores, por lo tanto el virus no puede transportarse hacia este tejido, además las células que lo componen se reproducen tan rápido, que un virus no puede reproducirse a tal rapidez y no logra establecerse en este tejido.

#### 2.4 Cultivo de tejidos vegetales (CTV)

Usui K. *et. al* (1996) lo define como “el cultivo de células, tejidos y/o órganos extraídos de plantas, que se mantiene bajo condiciones artificiales y permite reproducir plantas que poseen todas las características de las plantas madre” (p.1). (Ver figura 9)



Figura 9. Explante de *Manihot esculenta* (yuca)

La parte de la planta que ha sido sembrada en un medio de cultivo *in vitro* se le llama explante, vitroplanta o masivo.

Los fundamentos de la técnica de cultivo de tejidos son las células totipotentes, estas guardan todas las funciones de las células, tiene la capacidad de regenerarse y formar un nuevo individuo debido a que contiene todo el material genético; otro fundamento es el balance hormonal, las hormonas son sustancias que produce la planta de forma natural, incidiendo en sus etapas fenológicas; donde forman tallo, raíz, fruto flores, entre otras.

El cultivo de tejidos permite una reproducción masiva en poco tiempo, estos agilizan los trabajos de mejoramiento genético. Además con esta técnica se conservan los recursos filogenéticos ya que se mantiene el material libre del ataque de plagas y enfermedades, sin

riesgo de pérdida por desastres naturales, ocupando el espacio mínimo y una fácil disponibilidad para caracterizarlo, multiplicarlo e intercambiarlo, además de mantener plantas sin virus, con un alto índice de multiplicación., sin afectarle las condiciones climáticas Villalobos *et al.* (citado en Solano, 2008).

El beneficio de utilizar estas técnicas es la producción uniforme de plantas que conservan los mismos caracteres de la planta de origen. Lopez- Baez *et. Al* (citado en Solano, 2008).

Las células vegetales poseen la característica de la totipotencia, es decir la capacidad de desarrollar una planta completa mediante el proceso de regeneración. El cultivo de tejidos vegetales utiliza esta característica de las plantas, el cual resulta muy eficiente, debido a que se proporciona un ambiente artificial favorable para el desarrollo de las plantas.

Se pueden producir metabolitos secundarios, que son materiales metabólicos que las plantas producen, estos tienen varios fines, pueden ser usados como medicamentos, aromas, materias colorantes, perfumes, vitaminas, fitohormonas, enzimas, etc. Aunque estos materiales se han producido tradicionalmente mediante la recolección de plantas silvestres, y/o a partir de un cultivo estabilizado para ese fin, se tiene la desventaja de que es muy difícil controlar la uniformidad de la producción. Por lo tanto, se espera que a través del cultivo de tejidos vegetales se pueda lograr una producción constante y homogénea a nivel industrial.

#### 2.4.1 Etapas del cultivo de Tejidos Vegetales.

El explante mientras se desarrolla pasa por varias etapas dentro del Cultivo de Tejidos Vegetales como se observa en la figura 10.

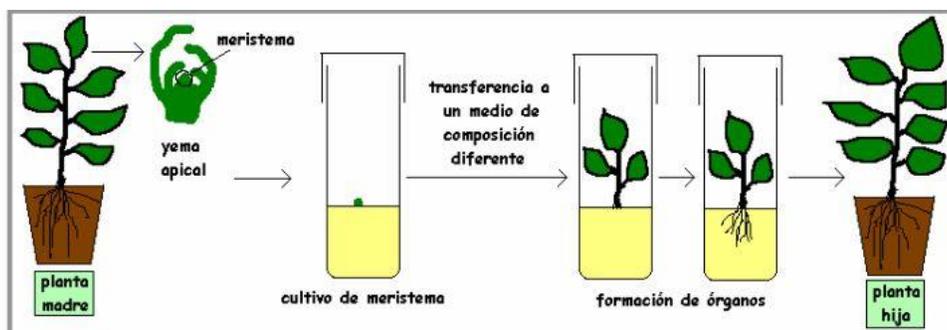


Figura 10. Etapas del Cultivo de Tejidos Vegetales Recuperado de “*Biotecnología Vegetal*”, de Universidad Abierta y a Distancia (UNAD) (2010) párr. 1

#### **2.4.1.1 Etapa 1.**

Establecimiento: Regeneración del material vegetativo previo a una desinfección y posteriormente a su adaptación en el medio nutritivo. Duración: 2-3 meses

#### **2.4.1.2 Etapa 2.**

Multiplicación: Generación de suficiente masa vegetativa para obtener la cantidad de plantas necesarias. Duración: 3-5 meses

#### **2.4.1.3 Etapa 3.**

Desarrollo: Desarrollo del material vegetativo. Duración 15-21 días

#### **2.4.1.4 Etapa 4.**

Enraizamiento: Estimulación del explante a la formación de raíces. Duración: 15-21 días

#### **2.4.1.5 Etapa 5.**

Aclimatación: Adaptación del medio ambiente artificial al medio ambiente natural. (C. Morales, comunicación personal, 07 junio, 2017)<sup>1</sup>

### **2.4.2 Medios de cultivo.**

Constituyen un elemento fundamental para el cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos para lograr el desarrollo de los mismos *in vitro*. Los medios de cultivo tienen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia y concentración estará en dependencia del objetivo que se persiga en su utilización. Los medios de cultivo están constituidos por sustancias minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares, reguladores del crecimiento y otros elementos. (Enciclopedia colaborativa en la red cubana (Ecu Red), (s.f))

El cultivo de células, tejidos y órganos de la plantas *in vitro* se realiza en medios de cultivos artificiales, lo cuales proporcionan los nutrientes necesarios que la planta toma de la tierra en su hábitat natural y precisamente el éxito de este tipo de cultivo está influenciado grandemente por la naturaleza del medio de cultivo utilizado y otros factores ambientales. (Ecu Red), (s.f))

---

<sup>1</sup> Ingeniero Agrónomo del Laboratorio de Biotecnología de la ENA

Según Usui K. *et. al* (1996):

Los medios de cultivo de tejidos están constituidos en su mayor parte por agua: por tanto, es necesario utilizar agua de intercambio iónico o agua destilada, ya que el agua natural incluye algunas sustancias que pueden causar alguna influencia negativa para el crecimiento de las plantas “IN-VITRO”. (p.33)

Según Usui K. *et. al* (1996) “Los componentes inorgánicos son importantes para el crecimiento de las plantas. Si escasean estos elementos, aparecen los síntomas característicos correspondientes a la deficiencia de cada elemento” (p.33).

Algunos componentes orgánicos utilizados en el medio nutritivo son las vitaminas, mio-inositol y Aminoácidos. Otros componentes pueden ser los naturales, que pueden ser agua de coco, caseína hidrolizada y extracto de malta (Usui K. *et. al* 1996)

#### **2.4.2.1 Fitohormonas.**

En micro propagación, principalmente se utilizan citocininas y auxinas como reguladores de crecimiento. Lo más importante es la proporción y cantidad de las mismas. (Usui K. *et. al* 1996)

Usui K. *et. al* (1996) define que:

*Las funciones para formación de yemas adventicias son:* Promoción: Auxina < Citocininas e Inhibición: Auxina > Citocinina, *para formación de raíces adventicias son:* Promoción: Auxina > Citocinina e Inhibición: Auxina < Citocinina y *para diferenciación de callo son:* Promoción: Auxina > Citocinina e Inhibición: Auxina < Citocinina. (p.35)

#### **2.4.2.2 Auxinas.**

Usui K. *et. al* (1996) dice que “se utilizan para promover la división celular y la diferenciación de raíces. Normalmente, se usan los compuestos siguientes como fuente de auxina: IAA (Ácido indolacético), NAA (Ácido naftalenacético), IBA (Ácido indolbutírico), 2,4-D (2,4-Acido diclorofenoxiacético)” (p.36).

Las auxinas regulan la proliferación de raíces y su elongación, tanto como la dominancia apical Mok y Mok (citado de Burgos A. Cenoz P. & Prause J., 2009)

Se dice que las citocininas y auxinas son los principales reguladores de micropropagación de la “yuca”, siendo la concentración de la hormona determinante del crecimiento de la planta Gonzalez (citado de Burgos A. *et al.*, 2009)

#### *2.4.2.2.1 Ácido Naftalenacético (ANA).*

Las auxinas se dividen en naturales y sintéticas, una auxina sintética es el Ácido naftalenacético (ANA), esta es una hormona inductora de enraizamiento, usada especialmente para promover el desarrollo de callo Vaca (citado de Cruz P., 2011)

Algunos de los efectos fisiológicos que promueve ANA son:

- Elongación celular en tallos
- División celular en presencia de citoquinina
- Formación de raíces adventicias en tallos
- Dominancia apical
- Diferenciación de xilema (Blanco A., 2008)

#### *2.4.2.3 Citocininas.*

Usui K. *et. al* (1996) deduce que:

Las citocininas se adicionan al medio de cultivo para promover la división celular y la diferenciación de yemas y brotes adventicios de callos y órganos. Se usan los compuestos siguientes como fuente de citocininas: Cinetina, BA (6-Benciladenedina), BAP (6-Bencilaminopurina), 2ip (N- Isopentenilaminopurina), Zeatina. (p.36)

##### *2.4.2.3.1 6-Bencilaminopurina (6-BAP).*

Es una hormona sintética, usada ampliamente para promover el desarrollo de yemas axilares, se presume que se encuentra en la planta, pero difícilmente se la encuentra Vaca (citado de Cruz P., 2011)

La citocinina 6-BAP puede retrasar la senescencia foliar de varias especies, reduciendo la degradación de pigmentos, de proteínas fotosintéticas y membranas cloroplásticas y manteniendo el equilibrio hídrico del tejido Dangl *et al.* (citado de Wilson C., Zavaleta H., López H. & Hernández A., 2008)

Las acciones y mecanismos de esta citocinina son:

- Promueve la división de las células
- Promueve el crecimiento y elongación de las células
- Promueve la germinación
- Reduce el crecimiento y elongación del tallo y hojas
- Regula el crecimiento de las raíces
- Inhibe el proceso de envejecimiento de las hojas
- Inhibe el desarrollo dominante de picos y promueve el crecimiento de capullos cercanos entre sí (FERTICHEM, s.f)

Otro componente del medio de cultivo es la fuente de carbono, las vitroplantas casi no realizan fotosíntesis, debido a la baja intensidad de luz en la que se desarrollan, estas producen poco azúcar. Los agentes gelificantes son otros componentes que se utilizan para solidificar el medio de cultivo (Usui K. *et. al*, 1996)

Otro factor importante es el pH (Exponente del ion hidrógeno), este produce un efecto en la absorción iónica, en los medio de cultivo. La acidez y la alcalinidad extremas inhiben el crecimiento de las vitroplantas (Usui K. *et. al*, 1996)

Existe un gran número de soluciones madre para el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, como Murashige & Skoog, 1962; Gamborg, 1968; Driver Kuniyuki Walnut 1984; Lloyd and. McCown, 1980, entre otras. A estas soluciones se les agregan vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento.

El Carbón activado es otro componente utilizado y sirve para disminuir los efectos de las secreciones de metabolitos fenólicos de las raíces en los cultivos del género *Manihot spp.* (Mafla G., Roa J., Aranzales E. y Debouck D., 2010).

En el cultivo de “yuca”, la baja temperatura, la alta concentración osmótica, la nutrición mineral reducida y los inhibidores de crecimiento, por un lado, y el crecimiento rápido y la longevidad de los cultivos, por otro, tienden a causar oscurecimiento de los tejidos, seguido por defoliación y deterioración eventual de los cultivos conservados *in vitro*. El oscurecimiento se le podría atribuir a la oxidación fenólica y la deterioración gradual a la inducción de senescencia por la acción de sustancias del tipo etileno, especialmente cuando se

utilizan frascos pequeños o cuando han sido tapados herméticamente (Roca, M. W. & Beltrán, J.,1984)

La adición de carbón activado al medio de conservación de “yuca” disminuye la defoliación (Roca, M. W. & Beltrán, J., 1984)

Otro componente utilizado es el agente gelificante para solidificar el medio de cultivo (Usui K. *et. al*, 1996)

Un factor importante en la preparación de medios de cultivo es el pH (exponente de ion hidrogeno), la concentración del ion H produce un efecto en la absorción iónica, en los medios de cultivo, la acidez y la alcalinidad extremas inhiben el crecimiento de las vitroplantas (Usui K. *et. al*, 1996)

#### **2.4.3 Técnicas de cultivo de tejidos vegetales (CTV).**

Según Usui K. *et. al* (1996) se han probado las técnicas siguientes:

##### ***2.4.3.1 Fusión de células (cultivo de protoplastos).***

Esta técnica es especial para mejoramiento genético. Las células de las plantas poseen paredes de celulosa las cuales se pegan entre si debido a la peptina. El tratamiento enzimático de células y pectinasa divide a las células en unidades individuales (protoplastos). (p.86)

##### ***2.4.3.2 Cultivo de anteras, cultivo de polen.***

Esta técnica se utiliza especialmente para inducir plantas haploides. Las células haploides tienen la mitad de cromosomas de una planta normal. El reactivo que se utiliza para doblar la cantidad de cromosomas se llama Colchicina, el cual después de aplicarlo, provoca que la planta posea los pares de cromosomas completos. Esos materiales son homocigotos (línea pura), por consiguiente, si algunos poseen un carácter deseable, son útiles para cruzamientos. (p.73)

##### ***2.4.3.3 Suspensiones celulares.***

Szabados L., Mroginski L., Roca W. (s.f) explican que las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio en

movimiento. Estas suspensiones pueden ser permanentes mediante el continuo suministro de nutrimentos. (p. 174)

#### ***2.4.3.4 Embriogénesis somática.***

La embriogénesis somática fue reportada por primera vez por Reinert 1958 y Steward 1958 en zanahoria. Sus trabajos se basan en el postulado de Haberland de 1902 que establece que “cualquier célula vegetal, cuando es expuesta a un ambiente y estímulos apropiados es capaz de regenerar una planta.” Sutton (citado en Solano W., 2008).

La embriogénesis somática consiste en la habilidad de las células competentes para cambiar su ruta de diferenciación a fin de convertirse en embriones somáticos (Williams y Maheswaran 1986). Se cree que los cultivos embriogénicos se pueden utilizar en la producción comercial de árboles. Es un método muy eficiente para reproducir plantas de mejoramiento genético y ofrece potencial para la conservación y la producción de un número ilimitado de plantas. Sutton (citado en Solano W., 2008).

Esta técnica da origen a un embrión a partir de células no sexuales, ya sea de un tallo, de una hoja, pétalo, raíz, entre otras.

#### ***2.4.3.5 Aislamiento de meristemo.***

Según Usui K. *et al* (1996):

Esta técnica se utiliza sobre todo para evitar la presencia de virus en las plantas. Para propagar plantas importantes en la agricultura que tienen problemas por contaminación, esta técnica de cultivo resulta muy eficaz. El tamaño del meristemo a utilizar para evitar la incidencia de virus dependerá de la especie. Algunas especies requieren un pretratamiento a alta temperatura antes de aislar el meristemo. Generalmente el meristemo que no tiene la base de la hoja no se encuentra infectado de virus, porque en esa región las células proliferan muy rápidamente. En esta región todavía no se ha diferenciado el sistema vascular. (p.70), como se observa en la fig. 11

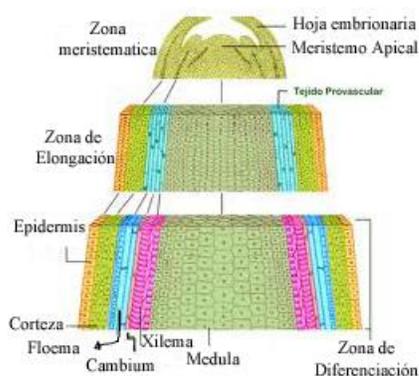


Figura 11. Partes de la zona meristemática Recuperado de “*Tejidos Meristemáticos*”, de Universidad de Granma (s.f) párr. 8

El meristemo se considera un tejido estéril, puesto que las células en este tejido se encuentran en constante división celular, a una velocidad que no es alcanzada por la reproducción de los virus. Además, el meristemo carece de vasos conductores, por lo tanto no hay forma de que los virus se transporten hacia este tejido. En el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la ENA una de las técnicas que trabajan es mediante la técnica de Aislamiento de meristemo, la cual ha resultado muy efectiva en la propagación de Caña, Plátano cuerno enano, Guineo de seda, bambú, monja blanca, cartucho, loroco, henequén y fresa (N. Guerrero, comunicación personal, 31 de mayo, 2018)<sup>2</sup>

Por esas razones el meristemo es la parte que tiene mayor posibilidad de ausencia de virus, por lo tanto es mejor obtener meristemos lo más pequeño posible, pero sin que esto ocasione una baja en la tasa de sobrevivencia en la fase de iniciación, por lo que preferentemente se deben obtener meristemos en diferentes tamaños (Usui K. *et. al* 1996).

El meristemo puede clasificarse dependiendo del lugar donde se encuentre: el meristemo apical se encuentra es donde se lleva a cabo del crecimiento aéreo, el meristemo radicular es el que se encuentra en la raíz, el caulinar se encuentra en el tallo y el lateral o secundario. La velocidad de división celular de los meristemos es mayor a la velocidad de reproducción de los virus. Se considera que de un meristemo se puede obtener de 3000 a 5000 plantas.

<sup>2</sup> Ingeniero agrónomo y Bióloga, Jefa del departamento de Biotecnología de la ENA

## 2.5 Antecedentes de cultivo *in vitro* de *Manihot esculenta*

En Honduras, en el año 2017, Asdrúbal Ulloa realizó un estudio sobre el efecto de 6-bencil aminopurina y ácido naftalenacético en la producción *in vitro* de segmentos nodales de yuca, en el cual se transfirieron microesquejes de yuca en etapa de multiplicación subcultivo uno, a medios de cultivo de Murashige y Skoog modificados y suplementados con fitohormonas. Se evaluaron cuatro tratamientos: el testigo sin fitohormonas y tres tratamientos suplementados con BAP a 0.5 mg/L y de ANA a 0.01 mg/L en diferentes combinaciones. El número de yemas fue mayor con BAP 0.5 mg/L y el BAP 0.5 mg/L + ANA 0.01 mg/L ya que produjeron mayor cantidad de yemas por microesqueje (9.64 y 9.12, respectivamente). Los vitro-esquejes obtenidos en estos tratamientos tuvieron crecimiento en forma de roseta (enanas y suculentas). El número de raíces y altura de la planta fue mayor en el medio testigo (sin suplementación de fitohormonas). Se recomienda evaluar el efecto del ácido giberélico en combinación con los tratamientos suplementados con BAP, los que presentaron mejor respuesta para la variable cantidad de yemas (Ulloa A., 2017)

En Venezuela, en el año 2009, Arelys Marín, José Gerardo Albarrán, Francia Fuenmayor y Dinaba Perdomo, realizaron un trabajo con el objetivo de evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración *in vitro* de cinco cultivares élites de yuca provenientes del CIAT. Los clones seleccionados fueron BRA 383, PER 183, CM 523-7, CM 3306-4 y SM 1565-15. Se usaron dos medios de cultivo semisólidos constituidos por sales minerales de Murashige y Skoog (1962), se diferenciaron por la siguiente combinación de reguladores de crecimiento: M1 (ANA 0,02 mg L<sup>-1</sup> + AG3 0,05 mg L<sup>-1</sup>) y M2 (ANA 0,02 mg L<sup>-1</sup> + AG3 0,05 mg L<sup>-1</sup> + BA 0,5 mg L<sup>-1</sup>). El medio M1 fue el mejor inductor para la regeneración de la mayoría de los cultivares evaluados, ya que hubo un buen desarrollo de brotes y raíces. Por el contrario el medio de cultivo M2 se observó poco desarrollo de brotes y raíces, en la mayoría de los clones evaluados. Se observó una respuesta diferencial del genotipo en el desarrollo *in vitro* de las plántulas. Los cultivares CM 523-7, PER 183 y BRA 383 mostraron los valores más altos para la mayoría de las variables evaluadas como: número de nudos, longitud de brotes y de raíces (Marín A., Albarrán J., Fuenmayor F., & Perdomo D., 2009)

En Venezuela, María Inés Cavallero establece procedimientos para la micropropagación de clones de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) cultivados en Argentina, mediante organogénesis y embriogénesis somática. Se realizó la introducción, regeneración y multiplicación de 28 clones de mandioca, en medio MS adicionado con 0,01 mg.l-1 de ANA + 0,01 mg.l-1 de BAP + 0,1 mg.l-1 de AG3. Se evaluó el efecto de diferentes citocininas sobre la morfogénesis caulinar y radical de mandioca. Los resultados mostraron que la adición de 1 mg.l-1 de BAP al medio MS favoreció la producción de múltiples vástagos, mientras que 2iP y CIN promovieron la regeneración de plantas en menor tiempo (Cavallero M., s.f)

En El Salvador se conoce que *Manihot esculenta* es propagada *in vitro* en el Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova" (CENTA)

### 3. Metodología

#### 3.1 Enfoque, Alcance y Diseño de la investigación

La investigación tuvo un enfoque cuantitativo, con un alcance descriptivo-explicativo; puesto que se evaluaron, midieron y recolectaron datos sobre las variables del fenómeno, así como también estuvo dirigida a responder por las causas de los mismos (Hernández R. Fernández C., & Baptista L., 2006).

El diseño de la investigación es experimental; específicamente es un experimento puro dado que se manipulo la variable independiente, es decir que se poseen grupos de comparación y equivalencia de los grupos (Hernández R. *et al.*, 2006).

Las variables independientes fueron las dosis de fitorreguladores: 6-Bencilaminopurina (6-BAP) y Ácido Naftalenacético (ANA). Se midieron y evaluaron las variables dependientes: altura, formación de nudos por explante y mortalidad de explantes.

#### 3.2 Descripción del área de estudio

La fase experimental se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología-Laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales de la ENA, ubicada en el Km 33 1/2 Carretera a Santa Ana, Ciudad Arce La Libertad República de El Salvador, C. A.

#### 3.3 Universo, población y muestra

##### 3.3.1 Universo.

Todos los arbustos de *Manihot esculenta* (yuca) de toda la ENA

##### 3.3.2 Población.

Todos los arbustos de *Manihot esculenta* (yuca) del vivero del Depto. de Biotecnología de la ENA

##### 3.3.3 Muestra.

Material vegetativo (brotes apicales) que se extrajo de los arbustos de *Manihot esculenta* (yuca) variedad Colombiana del vivero del Depto. de Biotecnología de la ENA

La muestra se tomó de manera intencionada seleccionando 120 arbustos de la variedad Colombiana, los cuales no presentaban enfermedades ni plagas, con 7 meses de edad, altura: 1.55 m, diámetro del tronco: 4.5cm y ancho de la hoja: 20 cm.

### 3.4 Recolección de datos

Esta fase se llevó a cabo entre los meses de Abril y Junio del año 2018. La toma de datos de cada serie se realizó una vez por semana hasta completar las ocho lecturas, divididas en 2 series de 20 unidades experimentales, como se muestra en la tabla 5.

Se elaboró una ficha para cada lectura (ver anexo A para pruebas completas).

Tabla 5  
*Distribución de la siembra seriada en fase de Establecimiento de Manihot esculenta*

| Semana   | Días de la semana |                  |
|----------|-------------------|------------------|
|          | Lunes             | Martes           |
| Semana 1 | T1 (20 unidades)  | T2 (20 unidades) |
| Semana 2 | T3 (20 unidades)  | T1 (20 unidades) |
| Semana 3 | T2 (20 unidades)  | T3 (20 unidades) |

*Nota.* Se realizaron 20 siembras por día, debido al tiempo disponible para realizar la siembra

#### 3.4.1 Fase de campo.

##### 3.4.1.1 Colecta del material vegetativo.

Esta colecta se realizó en horas tempranas del día, el material vegetativo colectado fueron los brotes apicales de la variedad Colombiana; la planta madre mostró características idóneas como: Ausencia de plagas y enfermedades, además presento las siguientes medidas:

- Altura: 1.55 m
- Diámetro del tronco: 4.5cm
- Ancho de la hoja: 20 cm

Las plantas madre se propagaron de forma asexual por medio de estacas en campo. Cuando se colecto el material, las plantas se encontraban a una Temperatura de 29°C, bajo un sombreador con 63% de sombra (ver anexo B para pruebas completas).

Para el manejo de las muestras se utilizó: un recipiente magenta con agua destilada y una hoja de bisturí n° diez.

### 3.4.2 Fase de Laboratorio.

#### 3.4.2.1 Diseño experimental.

Se organizaron los tratamientos en un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), se utilizó la mezcla de los fitorreguladores (6-BAP y ANA)

- Tratamiento 1 (6-BAP: 0 mg/L y ANA: 0 mg/L)
- Tratamiento 2 (6-BAP: 0.20 mg/L y ANA: 0.025 mg/L)
- Tratamiento 3 (6-BAP: 0.50 mg/L y ANA: 0.050 mg/L)

El total de tratamientos en estudio fueron 3, como se muestra en la tabla 6. Cada tratamiento consto de 40 repeticiones cada uno, siendo la unidad experimental cada tubo con un explante.

Tabla 6  
*Tratamientos con sus respectivas dosis de fitorreguladores y unidades experimentales para el establecimiento de Manihot esculenta*

| Tratamiento | Medio de cultivo   | 6-BAP (1lt) | ANA (1lt) | Unidades por serie | Numero de series | Total de unidades experimentales |
|-------------|--------------------|-------------|-----------|--------------------|------------------|----------------------------------|
| T1          | MS más suplementos | -           | -         | 20                 | 2                | 40                               |
| T2          | MS más suplementos | 0.20 mg     | 0.025mg   | 20                 | 2                | 40                               |
| T3          | MS más suplementos | 0.50 mg     | 0.050mg   | 20                 | 2                | 40                               |
|             |                    |             |           |                    |                  | 120                              |

*Nota.* Las dosis de fitorreguladores mostrados en la tabla son también utilizadas en el laboratorio de Biotecnología de la ENA para otras especies de plantas, por lo tanto se comprobó la reacción de *Manihot esculenta* con estas dosis

### 3.4.2.2 Preparación de soluciones MS.

Las sales MS se prepararon según las especificaciones técnicas del fabricante para 1Lt de solución, se diluyó esta cantidad en agua destilada caliente en un agitador magnético y se aplicó al medio de cultivo en preparación, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7  
Componentes de las sales MS

| N.   | Componentes                                    | Concentración | mg/l  | Cantidad requerida para 1 lt |
|------|--|---------------|-------|------------------------------|
| I    | Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) | 100X          | 1650  | 10 ml/l                      |
| II   | Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )          | 100X          | 1900  | 20 ml/l                      |
| III  | Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )          | 100X          | 440   | 20 ml/l                      |
| IV   | Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )        | 100X          | 370   | 10 ml/l                      |
| V    | Fosfato de potasio ( $\text{KPO}_4$ )          | 100X          | 170   | 10 ml/l                      |
| VI   | Hierro ( $\text{FeSO}_4$ )                     | 100X          | 27.8  | 10 ml/l                      |
| VII  | Microelementos                                 |               | Mg/l  | 10 ml/l                      |
|      | $\text{H}_3\text{BO}_3$                        | 100X          | 6.2   | 10 ml/l                      |
|      | $\text{MnSO}_4\text{H}_2\text{O}$              | 100X          | 22.3  | 10 ml/l                      |
|      | $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$       | 100X          | 8.6   | 10 ml/l                      |
|      | KI   | 100X          | 0.83  | 10 ml/l                      |
|      | $\text{NaMoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$      | 100X          | 2.5   | 10 ml/l                      |
|      | $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$       | 100X          | 0.025 | 10 ml/l                      |
|      | $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$       | 100X          | 0.025 | 10 ml/l                      |
|      | $\text{Na}_2\text{EDTA}_2\text{H}_2\text{O}$   | 100X          | 37.4  | 10 ml/ l                     |
| VIII | Vitaminas                                      |               | Mg/l  | 10 ml/l                      |
|      | Glicina  | 100X          | 2     | 10 ml/l                      |
|      | Acido nicotínico                               | 100X          | 0.5   | 10 ml/l                      |
|      | Piridoxina                                     | 100X          | 0.5   | 10 ml/l                      |
|      | Mioinositol                                    | 100X          | 100   | 10 ml/l                      |
|      | Tiamina  | 100X          | 0.1   | 10 ml/l                      |

Nota: Recuperado de “Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones”, de Roca W. & Mroginski L. (1991) p. 30

### 3.4.2.3 Preparación de solución madre de sustancias orgánicas.

Se adicionaron las sustancias orgánicas: glicina, Acido nicotínico, piridoxina, mioinositol y tiamina, estas se disolvieron todas juntas en 1Litro de agua destilada, se mezclaron y se conservaron en refrigeración hasta que llegue el momento de ser agregadas al medio de cultivo.

### 3.4.2.4 Preparación de solución madre de fitorreguladores.

Antes de adicionar los fitorreguladores se prepararon las soluciones madre de estos. Para 6-BAP la solución madre se preparó a una concentración de 1N y ANA a una concentración de 0.1N. Luego se tomó el volumen correspondiente a cada tratamiento.

### 3.4.2.5 Preparación de los tratamientos.

Para preparar los tratamientos se adicionaron las dosis de 6-BAP y ANA mostrados en la tabla 8, (ver anexo C para pruebas completas).

Tabla 8

*Componentes del medio de cultivo con sus respectivas dosis para Establecimiento in vitro de Manihot esculenta*

| Componentes          | Tratamiento 1<br>(1L) | Tratamiento 2<br>(1L) | Tratamiento 3<br>(1L) |
|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Agua destilada       | 500 ml                | 500 ml                | 500 ml                |
| Sacarosa             | 20 g                  | 20 g                  | 20 g                  |
| Sales MS             | 4.33 g                | 4.33 g                | 4.33g                 |
| Sustancias orgánicas | 10 ml                 | 10 ml                 | 10 ml                 |
| 6-BAP                | —                     | 0.20 mg               | 0.50 mg               |
| ANA                  | —                     | 0.025 mg              | 0.050 mg              |
| pH                   | 5.7                   | 5.7                   | 5.7                   |
| phytagel             | 2.4 g                 | 2.4 g                 | 2.4 g                 |
| Carbón activado      | 0.25 g                | 0.25 g                | 0.25 g                |

*Nota.* Sacarosa= azúcar del cañal comercial

Luego de haber preparado los tratamientos se retiraron los Erlenmeyer de los agitadores magnéticos, se vertió cada medio de cultivo en beakers plásticos, se dispensaron 20 ml de medio a cada tubo de ensayo y se taparon, luego se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 minutos a 20lb de presión, posteriormente se introdujeron en una gradilla y se dejaron reposando a 40° de inclinación hasta que el medio se enfrió.

#### ***3.4.2.6 Desinfección del material vegetativo.***

La desinfección del material vegetativo consistió en rociar con alcohol al 70% los materiales a utilizar, sumergir los brotes en una solución de hipoclorito de sodio al 5% y 3 gotas de Tween 80, durante 5 minutos en agitación. Luego dentro de la cámara de flujo laminar se realizaron tres lavados con agua destilada estéril y se secaron por 15 minutos. (C. Morales, comunicación personal 07 de abril, 2018)<sup>3</sup> (ver anexo D para pruebas completas).

#### ***3.4.2.7 Fase de establecimiento de meristemo.***

Dentro de la cámara de flujo laminar con aire mínimo, se tomó el brote apical para extraer el meristemo, considerado a una longitud de 0.1 mm. Mientras se sembraban, el material se mantuvo en un recipiente magenta cubierto con papel estéril para evitar deshidratación. Se sembró un meristemo por tubo de ensayo con 20 ml de medio nutritivo y se rotularon. Para esta fase se requirieron cajas petri, papel estéril, estereomicroscopio, pinzas, bisturís, mechero, alcohol y marcador, (para pruebas completas ver anexo E).

Luego los tubos de ensayo con explantes, se trasladaron en una gradilla al cuarto de incubación, a 25°C de temperatura y 20% humedad relativa; los explantes se mantuvieron en oscuridad por 10 días, luego se trasladaron a los estantes donde recibieron poca luz, solo con dos lámparas encendidas por 10 días, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad, después de ese tiempo recibieron toda la intensidad de luz con 4 lámparas encendidas por el resto de días hasta su establecimiento. La luz artificial es a través de lámparas fluorescentes de 2000 luxes

#### ***3.4.2.8 Variables evaluadas.***

Durante la investigación se evaluaron las variables: altura, formación de nudos y mortalidad de explantes.

---

<sup>3</sup> Ingeniero agrónomo del laboratorio de Biotecnología de la ENA

#### 3.4.2.8.1 *Altura de los explantes de Manihot esculenta.*

Se determinó la longitud de los explantes, para ello se utilizó papel milimetrado y la medida se expresó en centímetros (cm). Se evaluó a la octava semana de cultivo y se obtuvo un promedio por tratamiento. Se consideró la longitud del explante desde la base hasta el ápice.

#### 3.4.2.8.2 *Formación de nudos por explante de Manihot esculenta.*

Visualmente se contabilizó el número de nudos formados por el explante a las 8 semanas de cultivo y se obtuvo un promedio de estos por tratamiento. Se consideró como nudo a las zonas del tallo donde nacen las hojas.

#### 3.4.2.8.3 *Mortalidad de explantes de Manihot esculenta.*

Por simple inspección se determinó cuáles explantes estaban muertos y se obtuvo el porcentaje de estos por tratamiento. Para determinar si un explante está muerto debido a la ausencia de fitorreguladores, este presentó una coloración pálida amarillenta, en cambio el que estaba vivo mostró una coloración verde. Se verificó si la contaminación fue por hongo o por bacteria; si la contaminación fue por hongo, se observaron dentro del tubo de ensayo colonias blancas o café aterciopeladas con un aspecto pulverulento o algodonoso y en ocasiones estas presentaban el centro de color oscuro y si la contaminación fue de bacteria se observaron colonias puntiformes, irregulares, o rizoides, con superficie plana y bordes redondeados, de color amarillo suave y aspecto ceroso (C. Morales, comunicación personal 10 de mayo, 2018)<sup>4</sup>

### **3.5 Procesamiento y tabulación de datos**

Los datos fueron procesados con la ayuda del software estadístico InfoStat (versión 2018 ) para la formulación de tablas, así mismo, se utilizó el programa Excel 2010 para la elaboración de gráficos y para la toma de imágenes se utilizó un teléfono móvil Samsung Galaxy J5.

---

<sup>4</sup> Ingeniero agrónomo del laboratorio de Biotecnología de la ENA

### 3.6 Análisis de los datos

Para evaluar las variables en el establecimiento *in vitro* de “yuca”, se hizo lo siguiente:

-Los datos de la altura y el número de nudos por explante fueron interpretados mediante el análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, aplicada a la octava lectura que tendrá los datos acumulados de las lecturas previas. También se realizó el Test de Tukey  $\alpha = 0.05$  para comparar las medias de los diferentes tratamientos.

-La mortalidad se dividió por causa de muerte, ya sea debido al medio nutritivo (fitorreguladores), o por contaminación de bacteria u hongo, analizado con su respectivo porcentaje por tratamiento.

-El tratamiento escogido para formular el protocolo mostro los mejores resultados en cuento a la altura de los explantes, formación de nudos por explante y menor mortalidad a los 60 días de siembra, además de ser el tratamiento más económico de los que contienen fitorreguladores.

## 4. Resultados

### 4.1 Altura de los explantes de *Manihot esculenta*

Se evaluó el establecimiento del material vegetal, en donde se midió la altura del explante a los 60 días de realizada la siembra, tomando como fuente de variación las dosis de 6-Benzilaminopurina y Acido naftalenacético.

El tratamiento con mayor altura fue el T2 (0.20mg de BAP y 0.025mg de ANA) en el que los explantes mostraron longitudes desde 0.3 a 3cm, seguido del T3 (0.50mg de BAP y 0.050mg de ANA) con longitudes desde 0.3 a 2.5 cm y el tratamiento con menor altura fue el T1 (sin fitorreguladores) en el que los explantes mostraron longitudes desde 0.3 a 1.2 cm.

Como se muestra en la figura 12, el tratamiento que tuvo mayor promedio de altura de explantes fue el T2 seguido por el T3 y el tratamiento con menor promedio de altura fue el T1

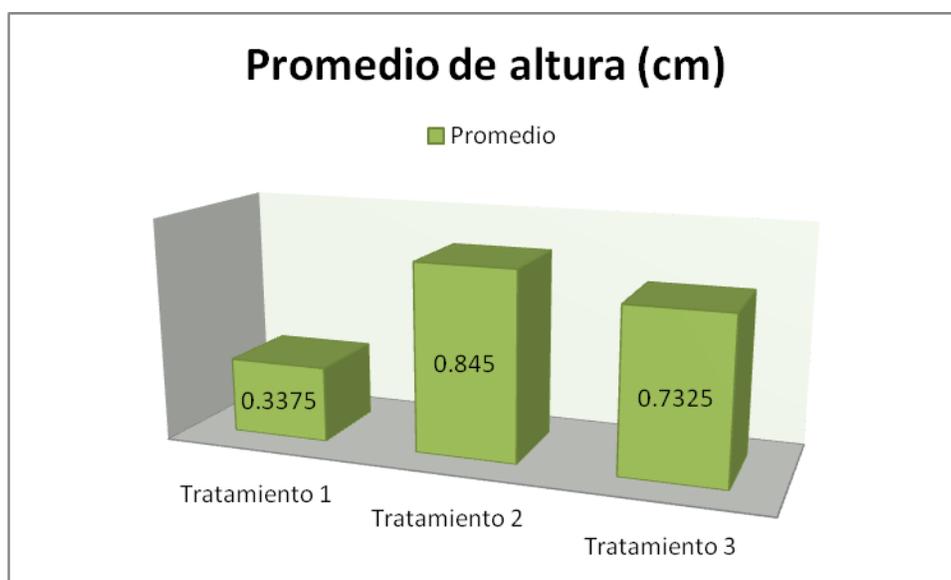


Figura 12. Promedio de altura de explantes de *Manihot esculenta* (yuca), en medios de cultivo suplementados con diferentes dosis de 6-Benzilaminopurina y Acido Naftalenacético

#### 4.1.1 ANOVA.

El análisis de varianza presentó diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos y la altura de explantes

El P valor mostrado en la tabla 9, es menor al nivel de significación ( $\alpha = 0.05$ ), lo cual indica que si hay diferencia significativa entre los tratamientos para la altura de los explantes.

Tabla 9

*Análisis de varianza para la altura de explantes por tratamiento in vitro de Manihot esculenta en la fase de Establecimiento*

**Análisis de la varianza**

| Variable | N   | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV     |
|----------|-----|----------------|-------------------|--------|
| Longitud | 120 | 0.10           | 0.08              | 103.96 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC    | gl  | CM   | F    | p-valor |
|-------------|-------|-----|------|------|---------|
| Modelo      | 5.68  | 2   | 2.84 | 6.45 | 0.0022  |
| Tratamiento | 5.68  | 2   | 2.84 | 6.45 | 0.0022  |
| Error       | 51.52 | 117 | 0.44 |      |         |
| Total       | 57.20 | 119 |      |      |         |

*Nota.* N=Tamaño de la muestra; R<sup>2</sup>= Valor R cuadrado; CV= Coeficiente de variación; F.V.= Fuente de variación; SC= Suma de cuadrados; gl= Grados de libertad; CM= Cuadrado medio; F= Factor estadístico de prueba

#### 4.1.2 Prueba de Tukey.

La prueba de Tukey si mostró variación en el promedio de altura entre algunos tratamientos y los que varían son entre el tratamiento 1 (sin fitorreguladores) y el tratamiento 2 (6-BAP 0.020 mg/L y ANA 0.025 mg/L) y entre el tratamiento 1 y tratamiento 3 (6-BAP 0.025 mg/L y ANA 0.050 mg/L), en cambio entre el T2 y T3 no hay variación (ver tabla 10).

Tabla 10

*Prueba de Tukey para la altura de explantes por tratamiento in vitro de Manihot esculenta en la fase de Establecimiento*

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.35225

Error: 0.4403 gl: 117

| Tratamiento   | Medias | n  | E.E. |   |
|---------------|--------|----|------|---|
| Tratamiento 1 | 0.34   | 40 | 0.10 | A |
| Tratamiento 3 | 0.73   | 40 | 0.10 | B |
| Tratamiento 2 | 0.85   | 40 | 0.10 | B |

*Nota.* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) DMS= Diferencia Mínima Significativa; n=Tamaño de la muestra de los grupos; gl=Grados de libertad

## 4.2 Formación de nudos por explante de *Manihot esculenta*

El tratamiento que tuvo mayor número de nudos con una cantidad de 104 nudos, fue el tratamiento 2 (0.20mg de 6-BAP y 0.025mg de ANA) seguido por el Tratamiento 3 (0.50mg de 6-BAP y 0.050mg de ANA) con 94 nudos en total y el tratamiento con menor número de nudos fue el Tratamiento 1 (sin fitorreguladores) con un total de 64 nudos.

La figura 13 muestra que el tratamiento que tuvo mayor promedio de formación de nudos en los explantes fue el T2 seguido por el T3 y el tratamiento con menor promedio de formación de nudos fue el T1

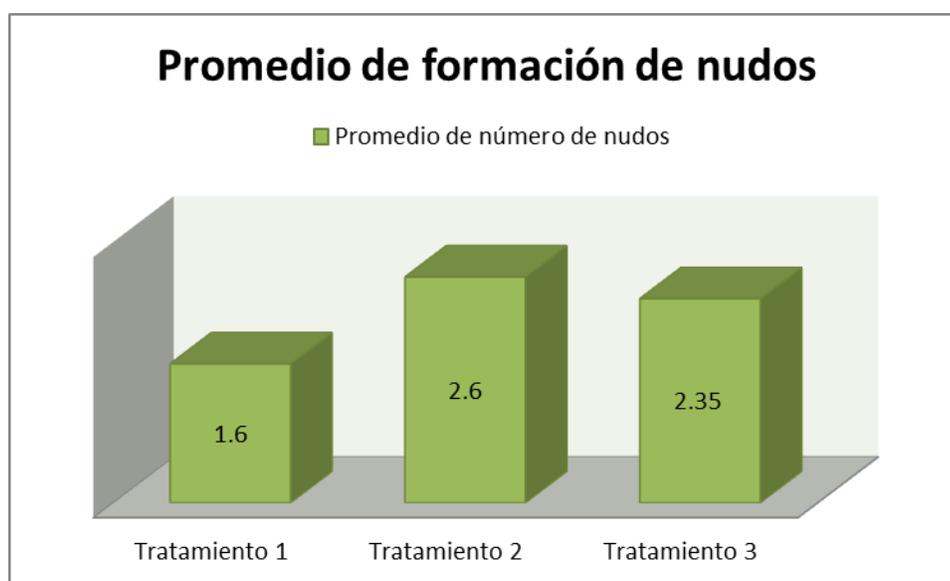


Figura 13. Promedio de número de nudos por explante de *Manihot esculenta* (yuca), en medios de cultivo suplementados con diferentes dosis de 6-Benzilaminopurina y Acido Naftalenacético

### 4.2.1 ANOVA.

El análisis de varianza presento diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los tratamientos y el número de nudos por explante.

El P valor mostrado en la tabla 11, es menor al nivel de significación ( $\alpha = 0.05$ ), lo cual indica que si hay diferencia significativa entre los tratamientos para el número de nudos por explante

Tabla 11

*Análisis de varianza para la formación de nudos de los explantes por tratamiento in vitro de Manihot esculenta, en la fase de Establecimiento*

**Análisis de la varianza**

| Variable        | N   | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-----------------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Numero de nudos | 120 | 0.05           | 0.04              | 83.22 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.         | SC     | gl  | CM    | F    | p-valor |
|--------------|--------|-----|-------|------|---------|
| Modelo       | 21.67  | 2   | 10.83 | 3.28 | 0.0411  |
| Tratamientos | 21.67  | 2   | 10.83 | 3.28 | 0.0411  |
| Error        | 386.30 | 117 | 3.30  |      |         |
| Total        | 407.97 | 119 |       |      |         |

*Nota.* N=Tamaño de la muestra; R<sup>2</sup>= Valor R cuadrado; CV= Coeficiente de variación; F.V.= Fuente de variación; SC= Suma de cuadrados; gl= Grados de libertad; CM= Cuadrado medio; F= Factor estadístico de prueba

**4.2.2 Prueba de Tukey.**

La prueba de Tukey si mostró variación en el promedio de número de nudos por explante entre algunos tratamientos y los que varían son entre el T1 (sin fitorreguladores) y el T2 (6-BAP 0.020 mg/L y ANA 0.025 mg/L), en cambio entre los tratamientos T1 y T3 (6-BAP: 0.50 mg/L y ANA: 0.050 mg/L); T2 y T3 no presentaron variación, como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12

*Prueba de Tukey para la formación de nudos de los explantes por tratamiento in vitro de Manihot esculenta en la fase de Establecimiento*

**Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.96454**

**Error: 3.3017 gl: 117**

| Tratamientos  | Medias | n  | E.E. |     |
|---------------|--------|----|------|-----|
| Tratamiento 1 | 1.60   | 40 | 0.29 | A   |
| Tratamiento 3 | 2.35   | 40 | 0.29 | A B |
| Tratamiento 2 | 2.60   | 40 | 0.29 | B   |

*Nota.* Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ ) DMS= Diferencia Mínima Significativa; n=Tamaño de la muestra de los grupos; gl=Grados de libertad

### 4.3 Mortalidad de explantes de *Manihot esculenta*

Como se muestra en la figura 14, figura15 y figura16, el tratamiento que no presentó mortalidad de explantes fue el Tratamiento 2 (0.20mg de 6-BAP y 0.025mg de ANA), seguido del tratamiento 3 (0.50mg de 6-BAP y 0.050mg de ANA) que si obtuvo mortalidad y por último, el tratamiento con mayor porcentaje de mortalidad fue el Tratamiento 1 (sin fitorreguladores).

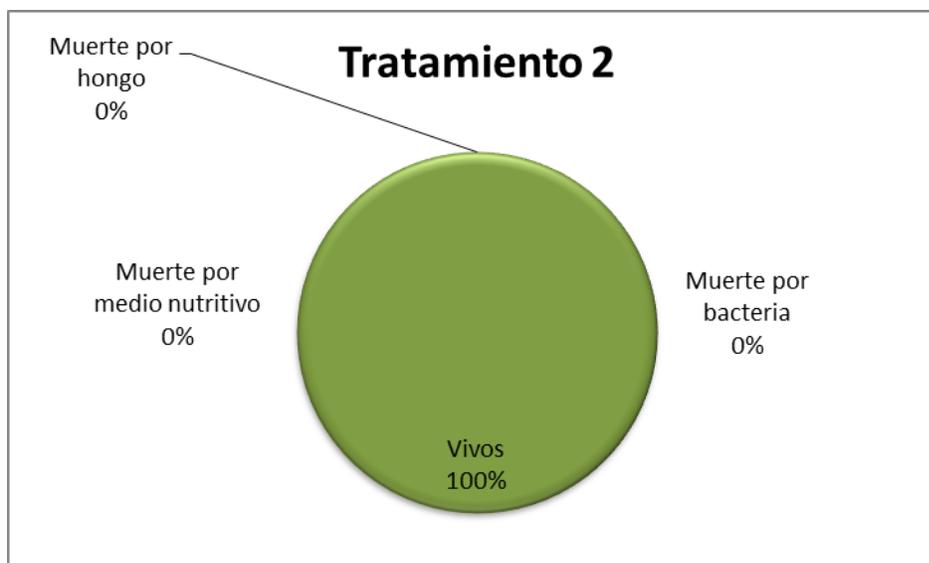


Figura 14. Porcentaje de mortalidad de explantes de *Manihot esculenta* (yuca), en medio de cultivo suplementado con 0.20 mg/L de 6-Benzilaminopurina y 0.0 25 mg/L de Ácido Naftalenacético

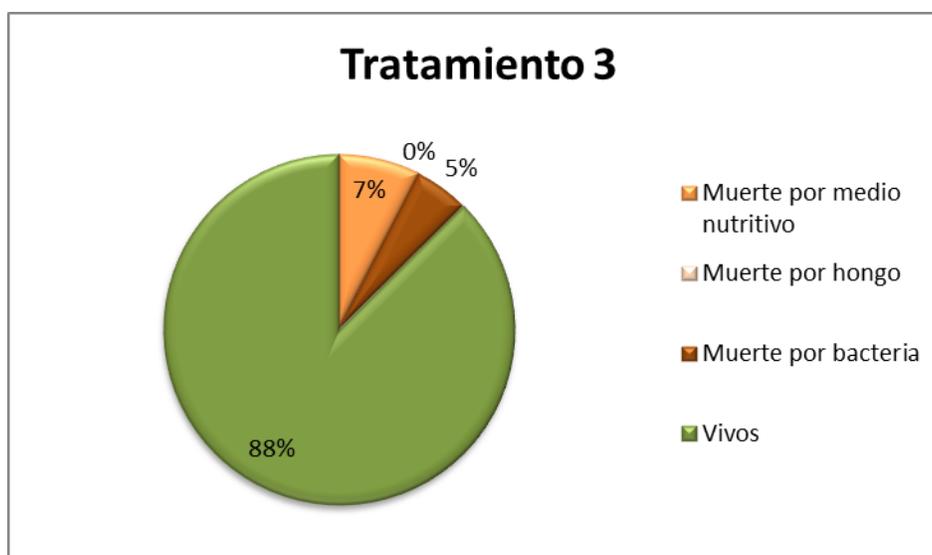


Figura 15. Porcentaje de mortalidad de explantes de *Manihot esculenta* (yuca), en medio de cultivo suplementado con 0.50 mg/L de 6-Benzilaminopurina y 0.050 mg/L de Ácido Naftalenacético

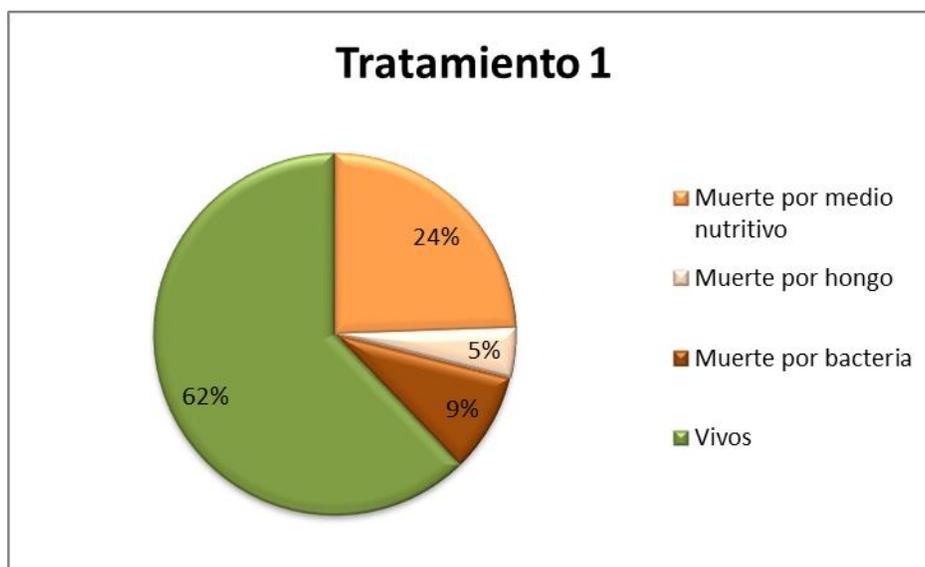


Figura 16. Porcentaje de mortalidad de explantes de *Manihot esculenta* (yuca), en medio de cultivo sin fitoreguladores

#### 4.4 Protocolo para Establecimiento de *Manihot esculenta* (yuca) mediante la técnica de Aislamiento de meristemo

Para formular el protocolo se tomó el tratamiento con los resultados más favorecedores, en cuanto a la altura de los explantes, formación de nudos por explante y menor mortalidad a los 60 días de siembra, además es el tratamiento más económico de los que contienen fitoreguladores. (Ver anexo F para pruebas completas).

##### 4.4.1 Selección de la planta madre.

La planta donadora de material vegetal no debe presentar enfermedades ni plagas. Además debe presentar las siguientes medidas:

- Altura: 1.55 m
- Diámetro del tronco: 4.5cm
- Ancho de la hoja: 20 cm

#### **4.4.2 Selección de los materiales.**

-Se debe utilizar un Bisturí estéril para coleccionar el material una vez seleccionado, se le realiza un corte a los brotes, luego estos se deben depositar en un recipiente magenta con agua destilada.

-Seleccionar y utilizar los brotes apicales, se debe cortar el brote con una longitud de 2cm

#### **4.4.3 Desinfección de los materiales.**

Instrumentos necesarios:

-Beacker

-Pinzas

-Rociador con alcohol al 70%

-Agua destilada

-Solución de hipoclorito de Sodio

-Tween-80

-Recipiente magenta

-Cámara de flujo laminar

-Agua destilada estéril

-Papel estéril

-Rociar los materiales a utilizar con alcohol al 70%

-Eliminar las hojas superficiales del brote, colocar el material en el beacker con la cantidad adecuada de agua destilada para diluir el hipoclorito de Sodio al 5%, agregar 3 gotas de tween-80, luego agitar durante 5 min

-Con la pinza se deben retirar de la solución y ser depositados en un recipiente magenta con agua destilada

-Se deben trasladar a la cámara de flujo laminar

-Dentro de la cámara de flujo laminar se deben realizar 3 enjuagues con agua destilada estéril

-Se deben secar en un papel estéril durante 15 min

-Se deben introducir en una caja magenta con papel estéril cubriendo el material para evitar deshidratación y contaminación

#### **4.4.4 Aislamiento de Meristemo.**

Instrumentos necesarios:

Cajas Petri esterilizadas (la cantidad necesaria)

Pinzas

Alcohol

Mango y hojas de bisturí

Mechero de bunsen

Estereomicroscopio

Cámara de flujo laminar

-Medio nutritivo: MS solidificado con 0.25g/L de phytigel, BAP 0.20 mg/L, ANA 0.025 mg/L, 20g/L de sacarosa y 0.25g/L de carbón activado; pH 5.70 (Distribuir 20 ml en cada tubo de ensayo). Se deberá esterilizar a 121°C durante 15 min a 20 libras de presión.

- Eliminar todas las hojas hasta poder encontrar el tejido meristemático, esto es el punto de crecimiento más uno o dos primordios foliares.

-Separar el tejido meristemático a partir de la base e inmediatamente colocarlo en el medio nutritivo (se debe tener cuidado de colocar el tejido vegetal correctamente sobre el medio, no de lado, ni al revés, ni hundido).

-Incubarlos bajo una iluminación de 2000 lux, una temperatura de 25°C y humedad relativa de 20%

-Los primeros 10 días los explantes se deben mantener en oscuridad, luego se deben trasladar a los estantes donde reciben poca luz (2 lámparas) por 10 días, y luego deben recibir toda la intensidad de luz (4 lámparas) hasta dos meses, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad.

## 5. Discusión

Las variables fueron evaluadas a los 60 días de siembra

### 5.1 Altura de los explantes de *Manihot esculenta*:

Como se muestra en la tabla 10, la prueba de Tukey muestra que hay diferencia significativa del T1 (sin fitorreguladores) respecto a los tratamientos con fitorreguladores (T2 y T3), en cambio el T2 y T3 estadísticamente presentaron resultados similares en el promedio de longitud de los explantes, lo que indica que los 0.30 mg de 6-BAP y los 0.025 mg de ANA que hay de diferencia entre estos, no afectó de forma diferente al crecimiento de los explantes, probablemente esto se debe a que el explante en presencia de fitorreguladores es estimulado a crecer en mayor cantidad, pues las auxinas promueven el crecimiento en longitud del explante y 6-BAP promueve la división de las células, regula el crecimiento y elongación de tallos y hojas, pero puede inhibir el desarrollo dominante apical si se encuentra en cantidades altas.

En este caso, la cantidad utilizada de 6-BAP es menor o igual a 0.5 mg, es por esto que los explantes crecieron en altura, de haber sido una dosis mayor hubieran crecido de forma lateral formando callos y brotes cortos, en lugar de crecer de forma apical, Urrutia (citado de Ulloa A., 2017)

Los resultados antes mencionado, difieren con Ulloa A. (2017), quien en su investigación utilizó segmentos nodales, presentó mayor longitud en el testigo (sin fitorreguladores) en comparación con los tratamientos que utiliza 6-BAP y ANA. Esto posiblemente se debe a que Ulloa utilizó dosis muy altas de 6-BAP y muy bajas de ANA, ya que el mismo autor plantea que al haber mucha diferencia entre las dosis de una citocinina (6-BAP) y una auxina (ANA) habrá un incremento del efecto del fitorregulador que está en mayor concentración.

En su investigación había mucha concentración de 6-BAP y una dosis casi nula de ANA, lo cual creó que se rompiera la dominancia apical reduciendo el crecimiento vertical del explante, formando segmentos cortos, debido a que 6-BAP tiene la función de inducir el crecimiento lateral y retrasar el apical.

## **5.2 Formación de nudos por explante de *Manihot esculenta*:**

Según el análisis de varianza existe una diferencia estadísticamente significativa en el número de nudos por explante, lo que demuestra que la variación de dosis de 6-BAP y ANA en el medio nutritivo inciden en el número de nudos por explante en el establecimiento *in vitro* del cultivo de *Manihot esculenta*, es decir que los fitorreguladores tuvieron un efecto directo sobre el número de nudos. La prueba de Tukey indicó, que si existe variación entre tratamientos y los que varían son entre el tratamiento 1 (sin fitorreguladores) y el tratamiento 2 (0.20 mg/L de 6-BAP y 0.025ml/L de ANA) y los que no varían son entre el T1 y T3 (0.50 mg/L de 6-BAP y 0.050 mg/L de ANA), ni tampoco entre el T2 y T3, es decir que probablemente la presencia de fitorreguladores si induce a la formación de nudos del explante, a consecuencia de que el 6-BAP es responsable de procesos de división y diferenciación celular y morfogénesis.

Entre los tratamientos T1 y T3 no hay diferencia significativa, lo cual indica que para formar mayor número de nudos e inducir a la elongación del tallo, el explante de “yuca” necesita fitorreguladores, pero en dosis mínimas, ya que una dosis alta de 6-BAP puede inhibir el crecimiento apical y la formación de nudos, puesto que la planta no sigue creciendo ni desarrollándose longitudinalmente, sino más bien, empieza a formar brotes laterales reduciendo el crecimiento apical, por lo tanto bajas dosis de 6-BAP generan mayor longitud, mayor desarrollo apical del explante y mayor formación de nudos.

## **5.3 Mortalidad de explantes de *Manihot esculenta*:**

El Tratamiento 2 (0.20 mg/L de 6-BAP y 0.025ml/L de ANA) no presentó mortalidad puesto que probablemente las dosis de fitorreguladores en el medio de cultivo fueron suficientes para el establecimiento de todos los explantes y tampoco hubo contaminación. El tratamiento 3 (0.50 mg/L de 6-BAP y 0.050 mg/L de ANA) presentó un 7% de mortalidad debido al medio nutritivo, ya que probablemente algunos explantes responden de forma diferente, puesto que cada uno es un individuo distinto. En vista de que el meristemo es estéril, la contaminación observada es exógena, a causa de la introducción del explante y la manipulación de este dentro del laboratorio.

El mayor porcentaje de mortalidad se observó en el T1 (sin fitorreguladores), esto puede deberse a la carencia de fitorreguladores, puesto que posiblemente algunos explantes de *Manihot esculenta* si necesitan fitorreguladores en el medio de cultivo para establecerse, ya que los fitorreguladores que contienen naturalmente no fueron suficientes para su desarrollo en esta etapa, puesto que estos se encuentran en cantidades muy bajas y se agotan al ser metabolizados por el explante, provocando la muerte de este al no tener otra fuente de hormonas. En cambio hay otros explantes que posiblemente si se establecen debido a los fitorreguladores que naturalmente se encuentran en el meristemo.

El menor porcentaje de mortalidad fue a causa de la contaminación exógena, en mayor cantidad por bacteria que por hongo, debido a la manipulación del explante, ya que no se está exento de la contaminación en el cultivo *in vitro*.

#### **5.4 Protocolo**

Se formuló el protocolo a partir del tratamiento 2 (6-BAP: 0.20mg/L y ANA: 0.025mg/L) con el cual se obtuvieron los mejores resultados con respecto a las 3 variables, se obtuvo mayor altura de los explantes, mayor formación de nudos y menos mortalidad, además de ser el tratamiento más económico de los que contienen fitorreguladores.

## 6. Conclusiones

Los tratamientos T2 (0.20 mg/L de 6-BAP y 0.025mg/L de ANA) y T3 (0.50 mg/L de 6-BAP y 0.050 mg/L de ANA) son eficientes para el establecimiento de *Manihot esculenta* (yuca).

El mejor tratamiento para formular el protocolo de establecimiento fue el T2, debido a su menor costo económico.

La adición de 6-BAP y ANA en el medio de cultivo incide en una mayor altura y mayor formación de nudos por explantes de *Manihot esculenta*.

La mayor causa de mortalidad se debe a la falta de fitorreguladores en el medio nutritivo.

## 7. Recomendaciones

Utilizar el T2 o T3 de acuerdo a las condiciones del laboratorio, pero se recomienda el T2 como protocolo de establecimiento, por ser más económico.

Adicionar 6-BAP y ANA al medio nutritivo para obtener mayor altura, mayor formación de nudos y evitar la muerte de los explantes de *Manihot esculenta*.

Realizar otras evaluaciones para formular protocolos de la fase de multiplicación, enraizamiento y aclimatación del cultivo de *Manihot esculenta*.

## 8. Literatura citada

- Aguilar E. (2017). *Manual del cultivo de yuca Manihot esculenta Crantz*, San Jose, C.R.: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), 2017 91p.
- Barbona S. (2011). *El cultivo de mandioca, técnicas para elevar la producción*. Argentina. Recuperado de <https://inta.gov.ar/documentos/el-cultivo-de-mandioca-tecnicas-para-elevar-la-produccion>
- Blanco A. (2008). *Hormonas Vegetales (1)*. Recuperado de [https://fisiohorticola.files.wordpress.com/2008/09/clase\\_3\\_-hormonas\\_vegetales\\_1\\_6pp.pdf](https://fisiohorticola.files.wordpress.com/2008/09/clase_3_-hormonas_vegetales_1_6pp.pdf)
- Burgos A. et al. (2009). *Efecto de la aplicación de auxinas sobre el proceso de enraizamiento de estacas de dos cultivares de mandioca (Manihot esculenta Crantz)*. Corrientes, Argentina. Recuperado de <file:///C:/Users/MarielosA/Downloads/Dialnet EfectoDeLa AplicacionDeAuxinas SobreElProcesoDeEnrai-3358191.pdf>
- CAD, (2003). *Manual de Fitoprotección y Análisis de Plaguicidas* Fundación Chemonics Colombia, Octubre 2003
- Carrión E. et al. (2010). *Manejo integrado de yuca (Manihot esculenta)*. Venezuela. Recuperado de <https://es.slideshare.net/guest4ba9732e/cultivo-de-yuca-udo-monagas>
- CATIE & INRENARE (1995). *Memorias: Seminario Técnico, Fertilización forestal*. Santiago, Veraguas – Panamá
- Cavallero M., (s.f) *Micropropagación de cultivares de mandioca (Manihot esculenta Crantz) de interés para Argentina*. Argentina
- Ceballos, Hernán; De la Cruz A., Gabriel Antonio. (2002). *Taxonomía y morfología de la yuca*. In: Ospina P., Bernardo; Ceballos, Hernán; Alvarez, Elizabeth; Bellotti, Anthony C.; Calvert, Lee A.; Arias V., Bernardo; Cadavid L., Luis Fernando; Pineda L., Benjamín; Llano R., Germán Alberto; Cuervo, Maritza I. (eds.). *La yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Consorcio

- Latinoamericano para la Investigación y el Desarrollo de la Yuca; Proyecto IP-3 de Mejoramiento de Yuca, Cali, CO. p. 17-33. (Publicación CIAT no. 327)
- Cruz P. (2011). *Evaluación de diferentes dosis de auxinas (ANA- IBA) y citocinina (BA) para el desarrollo de meristemas en Maxillaria grandis Rchb.* (Tesis de grado) Ecuador.
- Ecu Red (s.f). *Medio de cultivo para la propagación in vitro.* Recuperado de [https://www.Ecured.cu/Medios\\_de\\_cultivo\\_para\\_la\\_propagacion\\_in\\_vitro](https://www.Ecured.cu/Medios_de_cultivo_para_la_propagacion_in_vitro)
- FAO (s.f). *Impacto del desarrollo de la yuca en la seguridad alimentaria y la nutrición de los pobres de las zonas rurales* Recuperado de [http://www.fao.org/fsnforum/sites/default/files/files/33\\_Cassava/SUMMARY\\_ES\\_ImpactOfCassavaDevelopmentOnFSNofRuralPoor.pdf](http://www.fao.org/fsnforum/sites/default/files/files/33_Cassava/SUMMARY_ES_ImpactOfCassavaDevelopmentOnFSNofRuralPoor.pdf)
- FERTICHEM (s.f). *6-N- BENCIL AMINOPURINA.* Cuernavaca. Mor, México. Recuperado de [http://www.fertichem.com.mx/pdf/6\\_bencil.pdf](http://www.fertichem.com.mx/pdf/6_bencil.pdf)
- Frete F. (2010). *Mandioca una opción industrial.* Paraguay vende, Rca. Francesa, Asunción, Paraguay. Recuperado de <https://www.usaid.gov/sites/default/files/documents/1862/mandioca.pdf>
- Giraldo A. (2006). *Estudio de la obtención de harina de hojas de yuca (Manihot esculenta Crantz) para consumo humano.* (Trabajo de grado) Popayán, Colombia
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2006). *Metodología de la investigación: Roberto Hernández Sampieri, Carlos Fernández Collado y Pilar Baptista Lucio* (4a. ed. --.). México D.F.: McGraw-Hill.
- Infoagro (s.f) *El cultivo de la yuca* Recuperado de <http://www.infoagro.com/hortalizas/yuca.htm>
- Mafla, G., Roa J., Aranzales E. Debouck D. (2010). *Manual de procedimientos para la conservación in vitro del germoplasma del genero Manihot.*, CIAT, Cali, Colombia
- Marín A. et al. (2009). *Evaluación del efecto de los reguladores de crecimiento en la regeneración in vitro de cinco cultivares élites de yuca (Manihot esculenta Crantz).* Maracay, Aragua, Venezuela.

- Martínez, J. & Ramos A. (2012). *Estudio de factibilidad técnica y económica de hojas de yuca finamente triturada, como fortificante directo en la preparación de alimentos*. (Proyecto de graduación) La libertad, El Salvador
- Nicaragua K., Pavón F. & Chavarría E. (2004). *Guía MIP del cultivo de la yuca* 1ra. Edición, Managua, Nicaragua
- Roca W. & Mroginski L. (1991) *Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO.
- Roca, W. & Beltrán J. (1984). *El cultivo de meristemas para la conservación de germoplasma de yuca in vitro*, CIAT, Cali, Colombia
- Ruggiero M., Gordon D., Bailly N., Kirk P., Nicolson D. (2011). *The Catalogue of Life Taxonomic Classification, Edition 2, Part A*. In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2011 Annual Checklist (Bisby F.A., Roskov Y.R., Culham A., Orrell T.M., Nicolson D., Paglinawan L.E., Bailly N., Appeltans W., Kirk P.M., Bourgoign T., Baillargeon G., Ouvrard D., eds). DVD; Species 2000: Reading, UK.
- Solano W. (2008). *Embriogénesis somática en clones superiores de cacao (Theobroma cacao L.) obtenidos en el programa de mejoramiento genético del CATIE* (Tesis de maestría). CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- Suárez L. & Mederos V. (2011). *Apuntes sobre el cultivo de la yuca (Manihot esculenta Crantz). Tendencias actuales*. Vol. no.3 La Habana, Cuba.
- Szabados, L., Mroginski L., Roca W. (s.f). *Suspensiones celulares: descripción manipulación y aplicaciones*. Capítulo 8
- Ulloa A. (2017). *Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido naftalenacético en la producción in vitro de segmentos nodales de yuca (Manihot esculenta Crantz)*. (Proyecto de graduación). Honduras
- UNAD (2010). *Biotecnología Vegetal*. Recuperado de [http://biotecnologiaveg201529.blogspot.com/2010/05/tecnicas-biotecnologicas-para-la\\_24.html](http://biotecnologiaveg201529.blogspot.com/2010/05/tecnicas-biotecnologicas-para-la_24.html)

Universidad de Granma (s.f) *Tejidos Meristemáticos*. Recuperado de [https:// www.udg.co.cu/cmap/botanica/Tejidos\\_meristemáticos.htm](https://www.udg.co.cu/cmap/botanica/Tejidos_meristemáticos.htm)

Usui K. *et al.* (1996). *Principios básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Guatemala

Wilson-García C. *et al.* (2008). *La citocinina BAP retrasa senescencia, aumenta antioxidantes, proteína y crecimiento en pasto ovilla*. México. Recuperado de [http://www.scielo.org.mx /pdf/agro/v42n7/v42n7a6.pdf](http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v42n7/v42n7a6.pdf)

# ANEXOS

**Anexo A.** Datos de las variables a evaluar en el establecimiento *in vitro* de *Manihot esculenta* (yuca) por tratamiento

---

Cultivo *in vitro* de *Manihot esculenta* en presencia de BAP y ANA

---

N° de tratamiento:   2   N° de serie:   1   Fecha de siembra: 240418 Fecha de lectura: 190618

N° de lectura:   8  

| Meristemo | Longitud (cm) | Número de nudos | Mortalidad |
|-----------|---------------|-----------------|------------|
| 1         | 3             | 6               | No         |
| 2         | 3             | 6               | No         |
| 3         | 3             | 1               | No         |
| 4         | 1             | 3               | No         |
| 5         | 3             | 1               | No         |
| 6         | 1             | 3               | No         |
| 7         | 8             | 2               | No         |
| 8         | 5             | 2               | No         |
| 9         | 5             | 2               | No         |
| 10        | 3             | 1               | No         |
| 11        | 5             | 2               | No         |
| 12        | 2.8           | 6               | No         |
| 13        | 2             | 4               | No         |
| 14        | 1             | 3               | No         |
| 15        | 3             | 1               | No         |
| 16        | 2.5           | 6               | No         |
| 17        | 2.5           | 5               | No         |
| 18        | 5             | 2               | No         |
| 19        | 3             | 1               | No         |
| 20        | 2.8           | 5               | No         |

---

**Anexo B.** Planta madre de *Manihot esculenta* (yuca) donadora de material vegetal



**Anexo C.** Preparación de medio de cultivo para establecimiento de *Manihot esculenta* (yuca)



*Anexo C1.* Calculo del peso de la sacarosa  
(azúcar del cañal)



*Anexo C2.* Adición de soluciones madre



*Anexo C3.* Medición de la cantidad de fitorreguladores (6-BAP y ANA)

**Anexo D.** Desinfección de brotes apicales de *Manihot esculenta* (yuca)



*Anexo D1.* Instrumentos para la desinfección



*Anexo D2.* Tween 80 utilizado para una mayor solubilización de los compuestos



*Anexo D3.* Enjuagues con agua destilada estéril

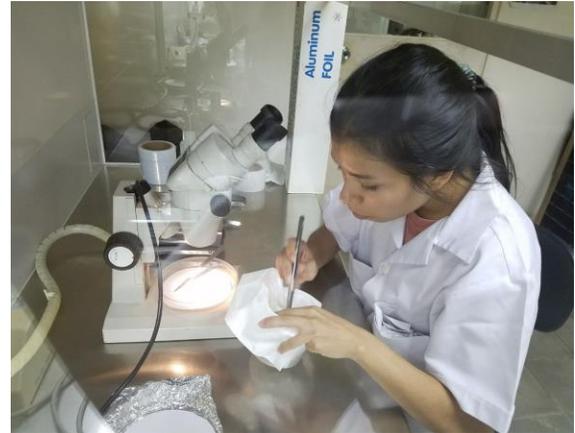


*Anexo D4.* Secado del material vegetal desinfectado

**Anexo E.** Extracción de meristemo de *Manihot esculenta* (yuca) dentro de la cámara de flujo laminar



*Anexo E1.* Instrumentos necesarios para la extracción de meristemo



*Anexo E2.* Toma de brotes apicales del recipiente magenta

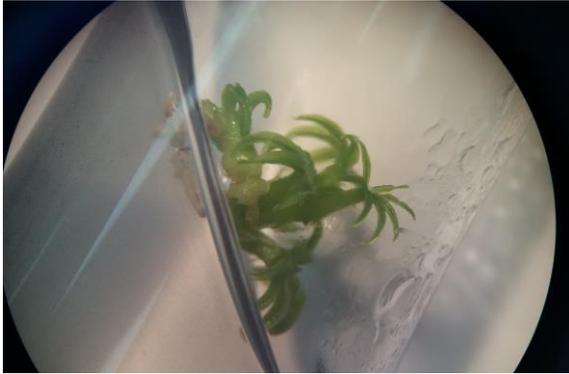


*Anexo E3.* Extracción del meristemo con ayuda de un estereomicroscopio



*Anexo E4.* Meristemo antes de ser extraído

**Anexo F.** Explantes de *Manihot esculenta* (yuca) de cada tratamiento evaluado a los 60 días



*Anexo F1.* Explante sano en el Tratamiento 1



*Anexo F2.* Explante sano en el tratamiento 2



*Anexo F3.* Explante sano en el tratamiento 3