

Efecto de la N⁶-bencilaminopurina sobre la multiplicación *in vitro* de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott)¹

Effect of the N⁶-benzylaminopurine on *in vitro* multiplication of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott)

J. Vilchez², Y. Rivas³, N. Albany⁴, M. Molina⁴ y L. Martínez³

²Departamento de Botánica, ³Laboratorio de Fisiología Vegetal «Merilyn Marin», ⁴Departamento de Química. Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia, AP 15205, Maracaibo, Edo. Zulia (4005ZU), República Bolivariana de Venezuela.

Resumen

En la micropropagación es muy importancia establecer el balance hormonal para cada una de las fases del proceso. Por ello, se realizó un ensayo para determinar la concentración de citoquinina adecuada para la inducción de brotes de ocumo *Xanthosoma sagittifolium* L. Schott en fase de multiplicación. Se evaluó el efecto de las concentraciones de 0, 2, 3, 4 mg.L⁻¹ de N⁶ bencilaminopurina (6-BAP) en dos subcultivos, sobre el número, longitud y biomasa de los brotes, biomasa fresca total, biomasa del tejido descartado e índice de incremento de crecimiento. Se evidencio que la incorporación de 2 mg.L⁻¹ de 6-BAP en los medios de cultivo fue determinante para la inducción de brotes; mientras que el resto de las variables evaluadas mostraron mayores valores con el incremento en el número de subcultivos. Se concluye que el uso de 6-BAP mejoró la multiplicación y calidad de los brotes de ocumo en comparación con el control.

Palabras clave: brote, citoquinina, malanga, *Xanthosoma sagittifolium*.

Abstract

In the micro propagation is very important to establish the hormonal balance for each one of the phases of process. Therefore, an essay was carried out to determine the appropriate concentration of cytokinin for the induction of cocoyam shoots *Xanthosoma sagittifolium* L. Schott in multiplication phase.

Recibido el 30-5-2008 • Aceptado el 13-11-2008

Autor de correspondencia e-mail: jvilchez@cantv.net; jvilchezp@luz.edu.ve

¹Proyecto autofinanciado registrado en el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad del Zulia. VAC-CONDES- CC-0398-07.

The effect of 0, 2, 3, 4 mg.L⁻¹ of N⁶ benzylaminopurine (6-BAP) concentrations was evaluated in two sub-crops, on the number, shoots longitude and biomass, total fresh biomass, discarded tissue biomass and index of growth increase. It was evident that the incorporation of 2 mg.L⁻¹ 6-BAP in the culture media was decisive for the shoots induction; while the rest of the evaluated variables showed higher values with the increase in the sub-crops numbers. It is conclude that the use of 6-BAP improved the multiplication and quality of the cocoyam shoots in comparison to control.

Key words: shoots, cytokinin, cocoyam, *Xanthosoma sagittifolium*.

Introducción

Dentro de las aráceas comestibles el ocumo criollo, blanco o malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott), es una planta herbácea perenne cultivada en muchos países tropicales y subtropicales, ya que sus tubérculos son una fuente de almidón fácilmente digerible; además, contienen proteínas y vitaminas como niacina, tiamina, riboflavina y vitamina C (Niba, 2003).

La propagación del ocumo es asexual, a partir de fragmentos del rizoma, por lo que el método de multiplicación favorece la diseminación de patógenos (Omokolo *et al.*, 2003). Esta situación amerita la búsqueda de alternativas que permitan la producción de propágulos de excelente calidad genética y fitosanitaria, a fin de poder lograr mayores beneficios en la producción de este cultivo.

Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos, basadas en la organogénesis directa como método de propagación, surgen como una posible alternativa a los problemas de calidad fitosanitaria del ocumo, ya que permite la eliminación de patógenos y rejuvenecer el material vegetal, haciéndolo más rendidor en campo (Orellana, 1998a).

Introduction

Inside of the edible araceae, the creole cocoyam, white or malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott), is one perennial herbaceous plant cultivated in many tropical and sub-tropical countries, because its tubers area constitutes one starch source easily digestible; also, they have proteins and vitamins like niacin, thiamine, riboflavin and vitamin C (Niba, 2003).

Cocoyam propagation is asexual, from rhizome fragments, so, the multiplication method favors the pathogens decrease (Omokolo *et al.*, 2003). This situation deserves the looking for alternatives that permit the production of genetic and healthy propagules of excellent quality, in order to achieve higher benefits in the production of this crop.

In vitro tissue crop techniques, based on direct organogenesis like propagation method, develop like a possible alternative to the problems of cocoyam health quality, because permits the pathogens elimination and rejuvenate the vegetal material, making it more productive in field (Orellana, 1998a).

Several efforts have been made to generate information that permit to

Se han realizado esfuerzos para generar información que permita usar exitosamente las técnicas de cultivo *in vitro* en ocumo (Gómez *et al.*, 1989; Rancillac *et al.*, 1987). Sin embargo, es necesario investigar más detalladamente acerca de los componentes de los medios de cultivo, específicamente el tipo y concentración de la citoquinina, ya que ésta determinará la formación de nuevos brotes a partir de meristemas, ápices o yemas preexistentes.

La cantidad citoquinina endógena en los meristemas y ápices es baja, debido a que el principal sitio de síntesis son las raíces, por lo que en estos casos la adición exógena de citoquinina en los medios de cultivo es una práctica generalizada. Orellana (1998b) señaló que la citoquinina más efectiva y empleada para la inducción de yemas axilares fue la N⁶ bencilaminopurina (6-BAP) con una frecuencia de 75% de los casos, seguida por la kinetina con 20% y el 2ip y zeatina con 3%.

Por lo anteriormente expuesto, se estudió el efecto de diferentes concentraciones de 6-BAP sobre la multiplicación *in vitro* de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott), para contribuir a establecer un protocolo de micropropagación en esta especie.

Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología "Silvia León de Sierralta", Facultad de Agronomía, Universidad del Zulia. El estudio se inició con la selección de brotes de ocumo de un segundo

use in a successful way the *in vitro* crop techniques in cocoyam (Gómez *et al.*, 1989; Rancillac *et al.*, 1987). However, it is necessary to research in a more detailed way about the components of cultivation methods, specifically the type and concentration of cytokinin, because this will determine the formation of new shoots from meristems, apex or pre-existents buds.

The quantity of endogenous cytokinin in meristems and apex is low because the main synthesis place is roots, therefore, in these cases; the exogenous addition of cytokinin in crops medium is a generalized practice. Orellana (1998b) establish that the more effective cytokinin, used for the axillary buds induction was the N⁶ benzylaminopurine (6-BAP) with a frequency of 75% of cases, followed by the kinetin with 20% and 2ip and zeatine with 3%.

Thus, the effect of different concentrations of 6-BAP on the *in vitro* multiplication of creole cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) was studied in order to establish a micro propagation protocol in this specie.

Materials and methods

Research was carried out in the Biotechnology Laboratory "Silvia León de Sierralta", Agronomy Faculty, University of Zulia. Study began with a selection of cocoyam buds of a second sub crop, grown in a medium formed by Murashige and Skoog salts (MS) (1962) supplemented with 30 g.L⁻¹ of sucrose, jellified with 4 g.L⁻¹ of Agargel (Sigma Chemical Co., EUA) and pH of 5.8.

subcultivo, crecidos en un medio constituido por las sales de Murashige y Skoog (MS) (1962) suplementado con 30 g.L⁻¹ de sacarosa, gelificado con 4 g.L⁻¹ de Agargel (Sigma Chemical Co., EUA) y pH de 5,8.

Se realizó un ensayo factorial 4x2 para evaluar cuatro concentraciones (0, 2, 3 y 4 mg.L⁻¹) de 6-BAP durante dos subcultivos consecutivos de cuatro semanas cada uno. El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorizado. El medio de cultivo usado para este experimento fue similar al descrito con anterioridad, adicionándole la concentración de 6-BAP requerida para cada tratamiento. Previo a la siembra de los explantes en el medio de cultivo, estos fueron decapitados y reducido su tamaño a 1,5 cm de longitud.

Se sembraron tres brotes de ocumo en frascos de vidrio de 200 mL de capacidad, cada uno con 25 mL de medio de cultivo, hasta completar 10 frascos para un total de 30 brotes por tratamiento. Los explantes fueron ubicados en un cuarto de crecimiento, con una temperatura promedio de 26±2°C bajo luz blanca fluorescente continua (40W), con una intensidad de 300 µmol m⁻² s⁻¹.

Después de cuatro semanas de cultivo se evaluaron las variables: número de brotes (NB): cantidad de brotes contabilizados por cada explante inoculado; longitud del brote (LB): medida en centímetros desde la base del cormo hasta la zona distal de la hoja más larga del brote; biomasa fresca de los brotes (MB): biomasa de cada uno de los brotes emitidos por explante inoculado; biomasa fresca total (MT): biomasa de

A factorial essay 4x2 for evaluating four concentrations (0, 2, 3 and 4 mg.L⁻¹) of 6-BAP during two subsequent sub-crops of four weeks each was used. A complete random design was used. The cultivation medium used for this experiment was similar to those previously described, by addition the 6-BAP concentration required for each treatment. Before explants sowing in the cultivation medium, these were decapitated and its size was reduced to 1.5 cm length.

Three cocoyam shoots were sowed into glass flasks with capacity of 200 mL, each of them with 25 mL of cultivation medium, until finishing 10 flasks for a total of 30 shoots per treatment. Explants were placed on a growth chamber, with a mean temperature of 26±2°C under continue fluorescent white light (40W), with an intensity of 300 µmol m⁻² s⁻¹.

After four cultivation weeks, the following variables were evaluated: shoots number (SN): Shoots quantity counted by each inoculated explant; shoot length (SL): measured in cm from corm basement to the distal area of the longer leaf of shoot; shoots fresh biomass (SFB): biomass of each shoot emitted by inoculated explant; total fresh biomass (TFB): biomass of the entire explant and emitted shoots; discarded tissue biomass (DTB): discarded tissue biomass in each shoot, in the cleaning process (including leaves, roots and necrosed or damaged micro corm sections); growth increase index (GII): value obtained when applying the following formula: $GII = (TFB - IEB) \times IEB^{-1}$. For this, the inoculated explant biomass

todo el explante y de los brotes emitidos; biomasa del tejido descartado (MD): biomasa del tejido que se descartó de cada brote, en el proceso de limpiado del mismo (incluyendo hojas, raíces y secciones de microcormo necrosado o dañado); índice de incremento de crecimiento (IIC): valor obtenido al aplicar la siguiente fórmula: $IIC = (MT - MEI) \times MEI^{-1}$. Para ello fue medido previamente la biomasa del explante inoculado (MEI) antes de la siembra, en cada uno de los subcultivos evaluados.

Los datos de todas las variables estudiadas fueron evaluados mediante un análisis de la varianza simple y se realizó la prueba de comparación de medias por Tukey cuando las variables mostraron diferencias estadísticas. Todos los análisis se realizaron con el programa computarizado Statistix versión 8.0 para ambiente Windows (Microsoft®).

Resultados y discusión

El análisis estadístico detectó efecto de la interacción de las concentraciones de 6-BAP y el número de subcultivos para todas las variables estudiadas (cuadro 1). Los resultados indicaron que la inducción de nuevos brotes estuvo directamente relacionada con la incorporación de 6 BAP en los medios de cultivo a cualquiera de las concentraciones estudiadas e independientemente del número de subcultivo analizado. Para ambos subcultivos el NB por explante presentó valores superiores a 3 cuando se utilizó cualquiera de las concentraciones de 6 BAP mientras que los medios exentos de esta citoquinina

(IEB) was previously measured before sowing, in each of sub-crops evaluated.

Data of all studied variables were evaluated through a simple analysis of variance and also, the Tukey means comparison test was made when variables showed significant differences. All the analysis was accomplished by using the Statistix program, version 8.0 for Windows (Microsoft®).

Results and discussion

The statistical analysis detected an effect of concentrations interaction of 6-BAP and the sub-crops for all variables studied (table 1). Results showed that the new shoots induction was directly related to the incorporation of 6 BAP in the crops medium to any of concentrations studied and independently of sub-crop analyzed. For both sub-crops the SN by explant showed superior values to 3 when any of 6 BAP concentrations while exempt medium of this cytokinin showed lower inferior to 0.5 shoots by explant (table 1). This shows the necessity of incorporating this cytokinin to the crops medium for the phase of cocoyam multiplication.

The shoots number was similar to those obtained by Monge *et al.* (1987) in the multiplication of this same specie, but using kinetin combined with indole-acetic acid. Same behavior has been reported in the multiplication of other species like *Dionaea muscipula* Ellis, known with the name of "Venus atrapamoscas" (Jang *et al.*, 2003) and peach (*Prunus persica* L.) [Kadota and Niimi, 2003].

Cuadro 1. Efecto de las concentraciones de N⁶-bencilaminopurina (6-BAP) y el número de subcultivos en la multiplicación *in vitro* de ocumo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott). NB: número de brotes, LB: longitud de los brotes, MT: biomasa fresca total, MB: biomasa fresca de los brotes, MD: biomasa del tejido descartado e IIC: índice de incremento de crecimiento.

Table 1. Effect of N⁶-benzylaminopurine (6-BAP) concentrations and the sub-crops number on the cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) *in vitro* multiplication. SN: shoots number, SL: shoots length, TFB: total fresh biomass, SFB: shoots fresh biomass, DB: discarded biomass and GII: growth increase index.

Número de subcultivos	Concentración de 6 BAP (mg.L ⁻¹)	NB	LB (cm)	MT (g)	MB (g)	MD (g)	IIC
I	0	0,20 ^b	0,05 ^d	2,16 ^c	1,87 ^b	0,29 ^c	6,23 ^{cd}
	2	4,07 ^a	1,29 ^c	1,71 ^c	1,32 ^b	0,38 ^c	5,43 ^d
	3	4,20 ^a	1,36 ^c	1,81 ^c	1,29 ^b	0,51 ^c	5,63 ^d
	4	3,58 ^a	1,21 ^c	1,66 ^c	1,19 ^b	1,47 ^c	4,57 ^d
II	0	0,16 ^b	0,50 ^{cd}	3,82 ^b	1,78 ^b	2,04 ^a	11,25 ^{bc}
	2	3,95 ^a	4,65 ^{ab}	7,11 ^a	5,64 ^a	1,47 ^{ab}	18,10 ^a
	3	3,62 ^a	5,02 ^a	6,87 ^a	5,28 ^a	1,58 ^b	15,45 ^{ab}
	4	3,50 ^a	3,63 ^b	6,48 ^a	5,05 ^a	1,42 ^b	14,43 ^{ab}

Los valores identificados con distintas letras difieren estadísticamente (P<0,05) para la prueba de comparación de medias de Tukey.

mostraron valores inferiores a 0,5 brotes por explante (cuadro 1). Esto indica la necesidad de incorporar esta citoquinina a los medios de cultivo para la fase de multiplicación del ocumo.

El número de brotes fue similar al obtenido por Monge *et al.* (1987) en la multiplicación de esta misma especie, pero usando kinetina en combinación con ácido indolacético. Se ha reportado el mismo comportamiento en la multiplicación de otras especies como *Dionaea muscipula* Ellis, conocida con el nombre de atrapamoscas

Nevertheless, values found in this essay for the SN were lower to those reported by Ko *et al.* (2008), who obtained 5.9 shoots by explant in the multiplication of *Colocasia esculenta*, another edible araceae. This difference was caused by concentrations higher than 6 BAP (8 mg.L⁻¹) used for this authors, in combination with indole-acetic acid (3 mg.L⁻¹).

It is important to detach that in other essays (unpublished data) it was possible to observe that when the number of sub-crops increased, the

de Venus (Jang *et al.*, 2003) y durazno (*Prunus persica* L., Kadota y Niimi, 2003).

Sin embargo, los valores encontrados en este ensayo para el NB fueron inferiores a los señalados por Ko *et al.* (2008), quienes obtuvieron 5,9 brotes por explante en la multiplicación de *Colocasia esculenta*, otra arácea comestible. Esta diferencia se debió a concentraciones de 6 BAP superiores (8 mg.L⁻¹) utilizadas por estos autores, en combinación con ácido indolacético (3 mg.L⁻¹).

Es importante destacar que en otros ensayos realizados (datos no publicados) se pudo observar que a medida que aumentó el número de subcultivos se incrementó el NB, estabilizándose en 4 brotes por explante al utilizar 3 mg.L⁻¹ de 6-BAP. Al respecto, Rancillac *et al.* (1987); señalaron que a medida que se aumentó el número de subcultivos hubo una tendencia a incrementar el NB por explante.

La LB fue considerablemente mayor en el segundo subcultivo, con valores superiores a 4 cm para las concentraciones de 2 y 3 mg.L⁻¹ de 6-BAP (cuadro 1). Este comportamiento posiblemente estuvo relacionado con la activación del crecimiento celular causado por la adición de citoquinina al medio de cultivo (Monge *et al.*, 1987). Con la concentración más alta de 6-BAP (4 mg.L⁻¹) se produjeron brotes más pequeños que los obtenidos con 3 mg.L⁻¹, pero de longitud similar a los brotes cultivados con 2 mg.L⁻¹.

En términos generales hubo una compensación del crecimiento en el segundo subcultivo, para las variables

SN also increased, being stabilized in 4 shoots by explant when using 3 mg.L⁻¹ of 6-BAP. In relation to this, Rancillac *et al.* (1987), established that when the number of sub-crops increased, there was a tendency to increase the SN per explant.

LB was considerably higher in the second sub-crop, with values higher to 4 cm for the concentrations of 2 and 3 mg.L⁻¹ of 6-BAP (table 1). This behavior was possibly related to the activation of cell growth caused by the cytokinin addition to crop medium (Monge *et al.*, 1987). With the higher concentration of 6-BAP (4 mg.L⁻¹) smaller shoots than those obtained with 3 mg.L⁻¹ were obtained, but with a similar length to shoots cultivated with 2 mg.L⁻¹.

In general terms, there was growth compensation in the second sub-crop, for the variables SN and SL; it means, when comparing with the first sub-crop, the SN was lightly reduced, whereas length was considerably increased. Therefore, in the second sub-crop, the explant growth was more balanced between the quantity of emitted shoots and its length. This can be related with those reported by Orellana (1998a), who said that cytokinin added to the medium crops promoted development of lateral buds when counteract the apical dominance, the dormancy elimination that these buds showed in some species, stimulated the foliar expansion by effect of cellular enlargement. Venkatachalam *et al.* (2007), said that cytokinin are phytohormones that mainly takes part in the promotion of cellular division, even the effect could vary

NB y LB; es decir, al compararse con el primer subcultivo el NB se redujo ligeramente, mientras que la longitud se incrementó considerablemente. Por ello, en el segundo subcultivo el crecimiento de los explantes fue más equilibrado entre la cantidad de brotes emitidos y la longitud de los mismos. Lo anterior pudo estar relacionado con lo señalado por Orellana (1998a), quien indicó que las citoquininas incorporadas a los medios de cultivo promovieron el desarrollo de las yemas laterales al contrarrestar la dominancia apical, por lo que la eliminación de la dormancia que presentaron estas yemas en algunas especies, estimula la expansión foliar por efecto del alargamiento celular. Venkatachalam *et al.* (2007), señalaron que las citoquininas son fitohormonas que intervienen principalmente en la promoción de la división celular, aunque el efecto pudiera variar según el estado de diferenciación de las células, induciendo la formación de órganos, el desarrollo de brotes, estimulando la movilización de nutrientes y la síntesis de clorofila.

El objetivo de la fase de multiplicación es obtener el mayor número de brotes posible; sin embargo, estos brotes deben tener una longitud superior a un centímetro para poder facilitar su manejo al ser subcultivados y para incrementar la tasa de multiplicación, brotes de longitudes inferiores a un cm deben dejarse unidos al explante hasta que estén aptos para crecer independientemente del tejido que les dio origen. En este ensayo se obtuvo una LB que permitió manipular y separar los brotes para ser contabilizados en ambos subcultivos.

according to the cells differentiation state, by inducing the organs formation, the shoots development, by stimulating the nutrients mobilization and the chlorophyll synthesis.

The objective of the multiplication phase is to obtain the higher possible shoots number; however, these shoots have to have a higher length to one cm in order to facilitate its management to be subcultivated and to increase the multiplication rate, shoots of lower lengths to one cm have to be left grouped to the explant until they are suitable to grow independently of original tissue. In this essay, the SL obtained permitted to manipulate and separate shoots to be counted in both sub-crops.

The total fresh biomass, the shoots fresh biomass and the growth increase index showed higher values for the second sub-crop (table 1) when the cytokinin increased in the crop medium (figure 1). When comparing the second sub-crop respect to the first one, there was a considerable increase on TFB and the SFB, unlike the discarded tissue biomass which only showed a lightly increase. This relationship determined a higher GII for the second sub-crop in comparison to the first one, especially when cytokinin is added into the crop medium.

The differences found for the TFB, SFB and GII between the first and the second sub-group with the addition of 6-BAP, could be caused by the adaptation effect that explants experiment in the crops medium with

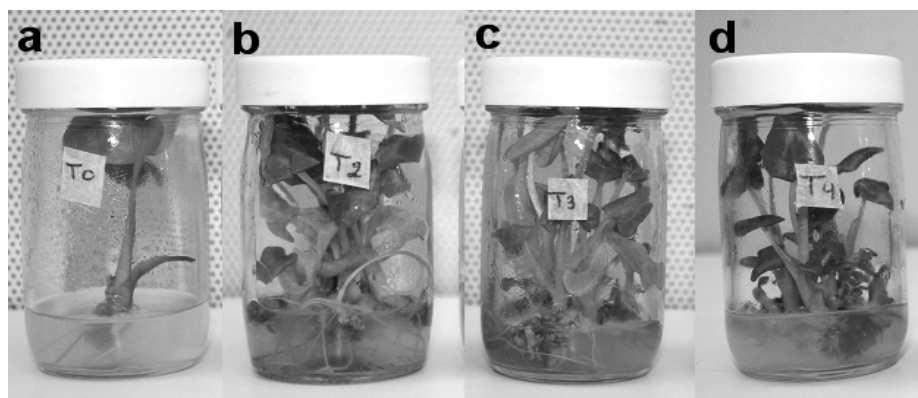


Figura 1. Aspecto general de brotes de ocumo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) de un segundo subcultivo multiplicados *in vitro* con N⁶ bencilaminopurina (6 BAP). (a): 0 mg.L⁻¹, (b): 2 mg.L⁻¹, (c): 3 mg.L⁻¹ y (d): 4 mg.L⁻¹.

Figure 1. General aspects of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) shoots of a second sub-crop multiplied *in vitro* with N⁶ benzylaminopurine (6 BAP). (a): 0 mg.L⁻¹, (b): 2 mg.L⁻¹, (c): 3 mg.L⁻¹ and (d): 4 mg.L⁻¹.

La biomasa fresca total, la biomasa fresca de los brotes y el índice de incremento de crecimiento mostraron valores superiores para el segundo subcultivo (cuadro 1) cuando se incorporó la citoquinina en el medio de cultivo (figura 1). Al comparar el segundo subcultivo con respecto al primero, se evidenció que hubo un incremento considerable de la MT y las MB, a diferencia de la biomasa del tejido descartado, la cual mostró sólo un ligero aumento. Esta relación determinó un mayor IIC para el segundo subcultivo en comparación con el primero, especialmente cuando se adiciono la citoquinina en el medio de cultivo.

Las diferencias encontradas

growth regulators, in which explants are accustomed to phytohormones when sub-crops increases. A similar effect has been reported by Rancillac *et al.* (1987) for the SN.

Even though the growth variables TFB, SFB, DTB and GII could show important data for selecting the proper phytohormones concentration to be added to the crops medium are lightly studied in the multiplication phase, perhaps for being the main objective the induction of new shoots (SN). Nevertheless, for the *in vitro* multiplication of *Dioscorea trifida* and *D. alata*, extremely low values were obtained for TFB (0.68 and 0.60 g respectively), in crops medium free of phytohormones (Chacón *et al.*, 2000).

para la MT, MB y IIC entre el primer y segundo subcultivo con la adición de 6-BAP, pueden deberse al efecto de adaptación que van experimentando los explantes en los medios de cultivo con reguladores de crecimiento, en el que estos explantes se habitúan a las fitohormonas a medida que se incrementan los subcultivos. Un efecto similar ha sido reportando por Rancillac *et al.* (1987) para el NB.

Aun cuando las variables de crecimiento MT, MB, MD y IIC pudieran arrojar datos importantes para seleccionar la concentración de fitohormonas apropiada para ser incorporada en los medios de cultivo, son poco estudiadas en la fase de multiplicación, quizás por ser el objetivo primordial la inducción de nuevos brotes (NB). Sin embargo, se encontró que para la multiplicación *in vitro* de *Dioscorea trifida* y *D. alata*, se obtuvieron valores extremadamente bajos de MT (0,68 y 0,60 g respectivamente), en medios de cultivo libres de fitohormonas (Chacón *et al.*, 2000).

Conclusiones

La adición de N⁶ benzilaminopurina en los medios de cultivo es determinante para la inducción de nuevos brotes durante la multiplicación *in vitro* de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott).

Se evidencio una consistente tendencia al incremento de los valores de las variables de crecimiento (longitud del brote, biomasa fresca total, biomasa del tejido descartado e índice de incremento de crecimiento), para el segundo subcultivo a excep-

Conclusions

The addition of N⁶ benzylaminopurine in the crops medium is decisive for the new shoots induction during the *in vitro* multiplication of creole cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott).

A consistent tendency to the increase of growth variables values was evidenced (shoot length, total fresh biomass, discarded tissue biomass and growth increase index), for the second sub-crop with exception of shoots number, which showed a similar behavior in both sub-crops.

Acknowledgment

Authors want to express their thanks to the Ing. Agr. Carlos Fernández by the supply of creole cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) vegetal material need for this research.

End of english version

ción del número de brotes, el cual mostró un comportamiento similar en ambos subcultivos.

Agradecimiento

Los autores desean agradecer al Ing. Agr. Carlos Fernández por la gentileza de facilitar el material vegetal de ocumo criollo (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) para la ejecución de la investigación.

Literatura citada

- Chacón, A., F. Saborio, L. Gómez, S. Torres y R. Valverde. 2000. El tipo de gelificante en el desarrollo *in vitro* y la aclimatización de plantas de yampi (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*). Agronomía Costarricense 24(2):57-64.
- Gómez, L., M. Monge, R. Valverde, O. Arias y T. Thorpe. 1989. Micropropagación de tres Aráceas comestibles libres de virus. Turrialba. 39:155-161.
- Jang, G., K. Kim y R. Park. 2003. Micropropagation of Venus fly trap by shoot culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture 12:95-98.
- Kadota, M. y Y. Niimi. 2003. Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity *in vitro* pear cultivar shoots. Plant Cell Tissue and Organ Culture 72:261-265.
- Ko, C., J. Kung y R. McDonald. 2008. *In vitro* micropropagation of white dasheen (*Colocassia esculenta*). African Journal of Biotechnology 7(1):41-43.
- Monge, M., O. Arias y P. Ramírez. 1987. Obtención de plantas de tiquizque blanco (*Xanthosoma sagittifolium*), de tiquizque morado (*Xanthosoma violaceum*) y de ñampi (*Colocassia esculenta*) libres de virus por medio del cultivo *in vitro* de ápices. Agronomía Costarricense 11:71-79.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- Niba, L. 2003. Processing effects on susceptibility of starch to digestion in some dietary starch sources. Int. J. Food Sci. Nutr 54:97-109.
- Rancillac, M., J. Nourrisseau, C. Navatel y P. Roudillac. 1987. Influence de la multiplication *in vitro* sur le comportement du plant fraiser en Francia. Acta Horticulturae 212:55-59.
- Omokolo, N., T. Boudjeko y J. Tsafack Takadong. 2003. *In vitro* tuberization of *Xanthosoma sagittifolium* L. Schott: effects of phytohormones, sucrose, nitrogen and photoperiod. Scientia Horticulturae 9(4):337-345.
- Orellana, P. 1998a. Introducción a la propagación masiva. pp 125-133. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J. (Ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Orellana, P. 1998b. Propagación vía organogénesis. pp 151-178. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. Pérez J. (Ed.). Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Venkatachalam, L., R. Sreedhar y E. Bhagyalakshmi. 2007. Micropropagation in banana using high levels of cytokinins does not involve any genetic changes as revealed by RAPD and ISSR markers. Plant Growth Regulator 51:193-205.