

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA



FACULTAD DE AGRONOMIA

ESCUELA DE PRODUCCION VEGETAL

TESIS DE GRADO

**Micropropagación *in vitro*
del clon de banano (*Musa sp.*)
Enano Ecuatoriano (AAA)**

AUTOR: Jeannethe Gutiérrez Barrera

ASESOR: Ing. MSc. Guillermo Reyes Castro

**Marzo de 1996
Managua, Nicaragua**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMIA
ESCUELA DE PRODUCCION VEGETAL**

TESIS DE GRADO

**Micropropagación *in vitro* del clon de
banano (*Musa sp.*)
Enano Ecuatoriano (AAA).**

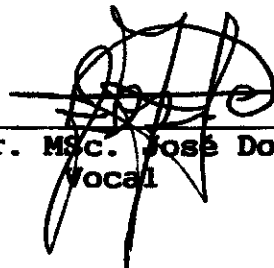
AUTOR : Jeannethe del Socorro Gutiérrez Barrera

ASESOR: Ing. Agr. MSc. Guillermo Reyes Castro

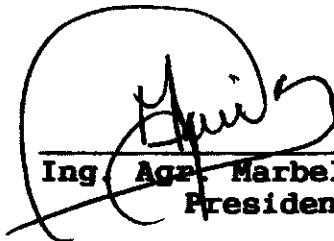
Presentada a la UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo con orientación en Producción Vegetal, siendo evaluada por el honorable jurado examinador compuesto de la siguiente manera:



**Lic. Carolina Vega Jarquín
Secretaria**



**Ing. Agr. MSc. José Dolores C.
Vocal**



**Ing. Agr. Marbell Aguilar
Presidente**

DEDICATORIA

A mi madre Martha Barrera Lara, como un sencillo reconocimiento a todos sus esfuerzos, por haberme dado el pan de la enseñanza y el don de la vida.

A mi pequeño hijo Kenneth Alonso Salmerón Gutiérrez, para que esta carrera sea tan solo la base de sus aspiraciones futuras.

A mi esposo Francisco Salmerón Miranda por la ejemplar perseverancia en sus luchas y por todo lo que significa en mi vida.

A mis hermanos Martha Lorena, Israel Antonio, María Lourdes, Claudia del Carmen, Marlon Antonio, Sarita Massiel y a José Alberto (q.e.p.d.) fijo en mi memoria por el imperecedero recuerdo de sus virtudes.

Al colectivo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional Agraria, como un reconocimiento a sus aunados esfuerzos por el estudio, desarrollo y aprovechamiento de la biotecnología para modernizar la producción agrícola de las especies de importancia en nuestro país.

A G R A D E C I M I E N T O S

De manera muy especial agradezco a mi asesor Ing. Agr. MSc. Guillermo Reyes Castro, quien me brindó la oportunidad de realizar el presente estudio, capacitándome y transmitiéndome sus experiencias y conocimientos sobre la técnica de micropropagación y por la confianza depositada en mí desde el inicio hasta la culminación del mismo. De igual forma agradezco al Ing. Marbell Aguilar y la Sra. Esmelda Bobadilla Bravo (Técnica del laboratorio de cultivo de tejidos) por la valiosa y espontánea cooperación brindada.

A los ingenieros agrónomos Marbel Aguilar, MSc. José Dolores Cisne, M.C. Leonardo García, MSc. Domingo Rivas y a la Lic. Mercedes Ordóñez por sus valiosos aportes y por el tiempo dedicado a la revisión del borrador del presente estudio. Así mismo agradezco al Doctor Henry Manuel Pedroza por todas las sugerencias y aportes en el análisis estadístico de los datos generados por el estudio.

Al Programa de Recursos Genéticos de Nicaragua y al Proyecto MOLISV que facilitaron los materiales y recursos necesarios para la realización de las fases de campo y laboratorio.

A Katty , Mireya y José Gabriel del CENIDA por su colaboración permanente en la adquisición de bibliografía.

A todos los docentes de la Universidad Nacional Agraria que contribuyeron a mi formación profesional y que luchan día a día por disminuir la brecha entre el desarrollo de las ciencias, la tecnología y su actualización científico-técnica.

INDICE GENERAL

<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA No.</u>
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iii
INDICE DE TABLAS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	vii
I INTRODUCCION	1
II REVISION DE LITERATURA	4
2.1 Generalidades	4
2.2 Métodos de propagación del banano	5
2.2.1 Propagación convencional	6
2.2.2 Método de propagación rápida	7
2.2.3 Micropropagación (por cultivo de tejidos)	9
2.2.3.1 Definición	9
2.2.3.2 Proceso de micropropagación	9
2.2.3.3 Reguladores de crecimiento	12
2.2.3.4 Ventajas y desventajas de la micropropagación	14
III MATERIALES Y METODOS	18
3.1 Materiales y equipos	18
3.2 Descripción del estudio	18
3.2.1 Fase I: Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	18
3.2.2 Fase II: Micropropagación	21
3.2.2.1 Formulación y preparación del medio basal	22

..... continuación

CONTENIDO**PÁGINA No.**

3.3	Diseño utilizado	25
3.4	Variables evaluadas	27
3.4.1	Número de hijos por planta	27
3.4.2	Presencia de multiyemas	27
3.4.3	Altura de planta (cm)	28
3.4.4	Peso de hijos por planta (mg)	28
3.4.5	Número de raíces por planta	28
3.4.6	Longitud de raíces por planta (mm)	28
IV	RESULTADOS Y DISCUSION	29
4.1	Fase I: Establecimiento del cultivo <i>in vitro</i>	29
4.2	Fase II: Micropropagación	33
4.2.1	Número de hijos	33
4.2.2	Presencia de multiyemas	40
4.2.3	Altura de planta (mm)	44
4.2.4	Peso de los hijos (mg)	46
4.2.5	Número de raíces	48
4.2.6	Longitud de las raíces (mm)	50
V	DISCUSION GENERAL	52
VI	CONCLUSIONES	57
VII	RECOMENDACIONES	59
VIII	REFERENCIAS	61

INDICE DE TABLAS

<u>TABLA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA No.</u>
1	Composición del medio de cultivo básico (MS) utilizado en la micropropagación de <i>Musa</i>	21
2	Arreglo de los tratamientos en estudio según las concentraciones de reguladores de crecimiento y la consistencia física del medio de cultivo.	25
3	Resultados obtenidos al final de la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> de ápices caulinares del clon de banano Enano Ecuatoriano (<i>Musa sp.</i>) (AAA).	28

INDICE DE FIGURAS

<u>FIGURA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA No.</u>
1	Esquema del proceso de multiplicación de yemas apicales de banano mediante la técnica de micropropagación.	23
2	Número promedio de hijos por explante y tratamientos obtenidos en el cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos	33
3	Tasa de proliferación por explante en tres sub-cultivos <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA)	35
4	Número promedio de multiyemas obtenidas en el cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos	39
5	Altura promedio (mm) por explante y tratamiento obtenido en el cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos	42
6	Peso promedio de hijos (mg) por explante y tratamiento obtenidos en el cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos	44
7	Número de raíces promedio por explante y tratamiento obtenidos en el cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos	46

..... *Continuación*

<u>FIGURA</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA No.</u>
8	Longitud de raíces promedio por explante y tratamiento obtenidos en el cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos	47
9	Valores promedios del número de hijos y multiyemas obtenidos en el cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA), durante tres sub-cultivos	49
10	Altura y peso promedio obtenidos en el cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA), durante tres sub-cultivos	50
11	Número y longitud de raíces promedio obtenidos en el cultivo <i>in vitro</i> del clon banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos	50

INDICE DE ANEXOS

<u>ANEXO</u>	<u>CONTENIDO</u>	<u>PAGINA No.</u>
I	Tabla 4. Valores promedios obtenidos para las variables en estudio durante el primer sub-cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA)	65
II	Tabla 5. Valores promedios obtenidos para las variables en estudio durante el segundo sub-cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA)	66
III	Tabla 6. Valores promedios obtenidos para las variables en estudio durante el tercer sub-cultivo <i>in vitro</i> del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA)	67

RESUMEN

Se establecieron *in vitro* yemas apicales de banano (*Musa sp.*) para su micropropagación durante tres sub-cultivos en un medio nutritivo artificial conteniendo sales minerales (MS), tiamina HCl, sacarosa y mio-inositol; variando con fines de estudio, la consistencia física del medio de cultivo (líquido y semi-sólido) y las concentraciones de reguladores de crecimiento: AIA = 0 y 1 mg/l y 6-BAP = 5, 7 y 10 mg/l. Durante el establecimiento y multiplicación de los explantes se utilizó un cuarto de crecimiento para la incubación con temperaturas de 25 ± 1 °C e intensidad lumínica de 2 000 lux. Inicialmente se establecieron *in vitro* 240 yemas apicales para su adaptación, de las cuales un 85 % (204) se adaptaron satisfactoriamente, el 15 % restante fueron descartados por contaminación, fenolización de las paredes del cormo o muerte de los explantes por no adaptación. La mayor contaminación se produjo por hongos y en menor medida por bacterias. La proliferación de hijos fue mayor en los medios de cultivo de consistencia semi-sólido en los tres sub-cultivos, correspondiendo los mejores resultados a la variante semi-sólida de los medios MS + 1 mg/l AIA + 10 mg/l 6-BAP con promedio de 3.7 hijos por explante y 11 hijos en total, seguido por el medio MS + 0 mg/ AIA + 7 mg/l 6-BAP con 3.6 hijos por explante y 10.8 en total al final de los tres sub-cultivos. La menor proliferación se presentó en la variante líquida del medio MS + 1 mg/l AIA + 10 mg/l 6-BAP con un promedio de 2.1 hijos por explante y 6.3 hijos en total. No se observó tendencia alguna en la proliferación de hijos con el aumento de los sub-cultivos, siendo evidente la influencia de la consistencia del medio de cultivo y la variación en los niveles de reguladores de crecimiento. El nivel más alto de 6-BAP (10 mg/l) utilizado indujo a la formación de multiyemas en los medios de cultivos líquidos, presentándose éstas a partir del II sub-cultivo. Los medios de consistencia líquida favorecieron el crecimiento *in vitro* de los explantes, expresándose en un incremento en la altura y peso. Así mismo los medios líquidos indujeron a un desarrollo y crecimiento de raíces en todos los tratamientos estudiados.

Palabras claves: Banano, yemas apicales, micropropagación *in vitro*, medios de cultivo, reguladores de crecimiento, sub-cultivos.

Abreviaturas: MS= Sales de Murashige y Skoog; AIA= Acido Indol Acético; 6-BAP= 6 Bencil Amino Purina y HCl= Acido Clorhídrico.

I. INTRODUCCION

El banano (*Musa sp.*), fue una de las primeras frutas que cultivaron los agricultores primitivos, según lo refieren Soto (1985) y Cronauer & Krikorian (1984). Las musáceas de acuerdo a estudios realizados por Simmonds (1973), son nativas del sur-este asiático.

El cultivo del banano es de mucha importancia para la economía de los países que lo producen, puesto que gran cantidad de éste se utiliza en la dieta para consumo local, además de los beneficios económicos que se derivan de la actividad bananera como es la generación de divisas, fuentes de trabajo e ingresos fiscales.

En Nicaragua la producción de banano se concentra en la región occidental del país (León y Chinandega) y según datos estadísticos reportados por CONAGRO/BID/PNUD (Comisión Nacional Agropecuaria / Banco Interamericano de Desarrollo / Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo) (1995), en el ciclo 1993/1994 el área de siembra fue de 2 500 hectáreas, con un volumen de 2 851.20 cajas de 18.14 kg y un valor de 69 398.2 miles de córdobas en total. Según el MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería) (1990), el cultivo del banano ocupa el tercer lugar en la generación de divisas al país siendo superado por los cultivos de café (*Coffea arábica* L.) y algodón (*Gossypium hirsutum* L.), con una tendencia a incrementar las exportaciones con la demanda en los últimos años de esta fruta tropical por parte de los países europeos.

La propagación vegetativa del cultivo del banano, tradicionalmente se realiza separando los hijuelos del cormo madre para utilizarlos como material de propagación. Este tipo de multiplicación trae consigo la diseminación de plagas y enfermedades por el material de siembra, además del bajo coeficiente de multiplicación de esta especie, esta

problemática plantea la necesidad de técnicas que permitan el fomento de este rubro. Al respecto, CONAGRO/BID/PNUD (1995), ha expresado que como parte de los actuales planes económicos de desarrollo de Nicaragua, el fomento de los rubros de exportación es determinante para potenciar la competitividad frente al mercado internacional.

Entre otras alternativas, para superar los problemas antes planteados, la técnica de micropropagación *in vitro* ha sido considerada por muchos investigadores como posible solución para aumentar los volúmenes de producción de material de siembra y mejorar la calidad de la semilla. Esta técnica permite una rápida reproducción del material de siembra, induciendo a la formación de brotes múltiples a partir de un solo meristema, obteniendo semilla asexual en mayor cantidad y mejor calidad que la que se ofrece tradicionalmente a los productores bananeros.

Actualmente se han desarrollado con gran éxito técnicas para la micropropagación de musáceas en muchos países del mundo como Estados Unidos, Israel, Sur Africa, Australia y Taiwán. En América Latina se destacan Brasil, Costa Rica, Cuba, Jamaica y Colombia (INIBAP, 1992).

En Nicaragua los estudios sobre micropropagación en cultivos de reproducción vegetativa, son recientes y están siendo impulsados principalmente por el Programa de Recursos Genéticos Nicaragüense (REGEN), perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria (UNA).

El presente estudio básico pretende contribuir al desarrollo de la agronomía nicaragüense marcando pautas para la implementación a gran escala de esta técnica.

Con la realización del presente trabajo investigativo se plantean los siguientes objetivos:

- 1. Desinfección de los explantes para su posterior implantación *in vitro*.**
- 2. Corroborar el uso de la técnica de cultivo de tejidos en la micropropagación del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) (*Musa sp.*), como herramienta para la reproducción masiva y rápida del cultivo.**
- 3. Determinar la combinación más efectiva de reguladores de crecimiento y consistencia del medio de cultivo, que induzca una óptima proliferación de yemas axilares durante tres sub-cultivos sucesivos.**

II. REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades

Los bananos y plátanos comestibles son nativos del sur-este asiático y se derivan de dos especies silvestres: *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla (Simmonds, 1973). Según Simmonds & Sherpherd (1955), los cultivares de *Musa sp.* en su mayoría evolucionaron a partir de la especie *Musa acuminata* Colla o de hibridaciones entre esta especie y *Musa balbisiana* Colla.

El género *Musa* se divide en cuatro secciones que son: Serie Eumusa, Rodochlamys, Australimusa y Callimusa, siendo la sección Eumusa la más importante, la que a su vez está conformada por cinco especies entre las cuales se encuentran las dos especies mas conocidas como son *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla (Simmonds, 1973).

Por la condición triploide de la mayoría de los cultivares de banano, su forma de reproducción sexual está asociada a la esterilidad, esto hace que su reproducción se efectúe exclusivamente de manera vegetativa (Simmonds, 1973).

Lahav & Turner (1992), refiere que la producción comercial del banano presenta algunos problemas a considerar como es el alto costo en su manejo debido a sus exigencias nutritivas pues pertenece al grupo de los cultivos con alta demanda de fertilizantes. Al respecto, Simmond (1973), indica que además de la alta demanda de nutrientes, otro problema en la producción de bananos es la susceptibilidad al ataque de hongos (*Mycosphaerella musicola* f., *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* c. y *Fusarium*

oxysporum f. var *cubense*), bacteria (*Erwinia* sp. c.) y nemátodos (*Radopholus similis* c.).

La producción mundial de musáceas se estima en más de 60 millones de toneladas al año, lo cual en su mayoría es utilizado para consumo local, y a pesar que las exportaciones solo representan el 11.6 % de la producción mundial, en los países de América tropical y el Caribe el cultivo del banano tiene especial importancia por los beneficios que se derivan de la actividad bananera, medidos a través de su contribución al producto interno bruto, el establecimiento de fuentes de empleo y la generación de divisas e ingresos fiscales (Jaramillo, 1987).

América Latina y el Caribe producen el 35 % de la producción mundial de musáceas, representando el sub grupo Cavendish el 30 % de la producción mundial de esta especie, del cual un 19.5 % es utilizado para consumo local y el 10.5 % es destinado a las exportaciones (INIBAP -International Network for the Improvement of Banana and Plantain-, 1992).

Torcía & Munguía (1993), refieren que el clon de banano Enano Ecuatoriano (Gran Enano), se caracteriza por plantas con alturas de entre 1.8 - 2.1 m, con una proporción largo/ancho de hoja de 2.00, un racimo cónico, ciclo de 11 meses y la forma interna de la mano número uno es curva.

Soto (1985), afirma que las plantas del clon Enano Ecuatoriano se adaptan a diversas condiciones ecológicas, son pequeñas y vigorosas, con un seudotallo muy grueso, de extensa área foliar y racimos muy grandes; el cormo con un sistema radicular extenso, raíces gruesas y fuertes, lo que permite su anclaje y evita el volcamiento de la planta.

2.2 Métodos de propagación del banano

Debido a que la mayoría de variedades comestibles que se derivan del género *Musa* no producen semillas (son triploides estériles partenocárpicas), su propagación es asexual. Los hijuelos del corno madre son separados para utilizarlos como propágulos (material de propagación). Sin embargo, la tasa de multiplicación que se obtiene para este cultivo mediante esta técnica es muy baja y además propicia la diseminación de diversas plagas y enfermedades (Pérez & Orellana, 1989a). Actualmente se conocen diferentes métodos de propagación vegetativa del banano dentro de los cuales los más importantes son el método convencional o tradicional, el método de propagación rápida y el método de micropropagación ó propagación *in vitro*.

2.2.1 Propagación convencional

El método convencional se basa principalmente en el establecimiento de semilleros en campos abiertos para la obtención de material de siembra. Esto implica poseer un área proporcional al área de plantación comercial a sembrar, incurriendo así en los costos que conlleva el manejo de esta área adicional (Molina, 1988).

Con el método convencional por cada semilla plantada se obtiene una producción de 10 semillas en un año, por lo tanto se debe sembrar en semilleros el 10 % del área total a cultivar. Las plantas destinadas para semillero no producen frutos, se les corta la inflorescencia para romper la dominancia apical y promover la producción de hijos. Se

deja a los hijos unas 6 semanas con la planta madre para asegurar su nutrición, posteriormente se separan de la planta madre cortándolos unos 20 cm por debajo del cormo. Un buen semillero puede producir de 8-10 semillas aceptables por planta madre al año. (Soto, 1985).

Un cormo de banano puede producir potencialmente hasta 40 yemas o más al año, sin embargo, no todas crecen hasta formar nuevas plantas y aún con los mejores métodos conocidos para estimular su desarrollo en el campo, en la práctica no se obtiene más de 20 hijos transplantables durante el primer año de siembra, por lo que el bajo coeficiente de reproducción por este método no es ventajoso para la utilización de semilla vegetativa a gran escala, además del riesgo de propagar plagas y enfermedades junto con el material de siembra (MIDINRA-IICA, 1983).

El éxito de una plantación comercial de banano se basa en gran parte en la calidad del material de siembra. Para el MIDINRA-IICA (1983), lo más recomendable es seleccionar semillas o cormos con alturas de 1.8 a 2.0 m., dicha altura la alcanzan a los 3 ó 4 meses de edad, un peso de 1.5 a 2.0 kg sin la parte aérea y hojas delgadas y puntiagudas, éstos hijos se conocen como hijos de aguja o de espada, siendo también conocidos como "cola de burro" en algunos lugares.

2.2.2 Método de propagación rápida

El método de propagación rápida consiste en promover la multiplicación o regeneración de cormos de banano, bajo condiciones especiales de manejo; para ello se

utilizan cormos de 3-5 kg a los que se les remueven las raíces, limpian y sumergen 20 minutos en fungicida benlate (Benomyl); luego se siembran los cormos en arena de río esterilizada; posteriormente, a las dos semanas, cuando los cormos han enraizado se corta el ápice y se vuelve a desinfectar, este corte elimina la dominancia apical y promueve el crecimiento de yemas laterales (Filippia & Pino, sf.).

Filippia (1987), utilizando el método de propagación rápida o Cámaras de Reproducción Acelerada de Semilla (CRAS) establecido en tierra (tipo cantero), obtuvo de 300 a 600 hijos por explante inicial a los 10, 12 y 14 meses de edad. Las CRAS presentan una serie de inconvenientes dentro de las que se mencionan las siguientes:

- Fácil contaminación de las cámaras con agentes patógenos y plagas.
- Dificultad al momento de plantar fracciones y yemas.
- Riesgo de daño mecánico al sistema radicular al momento de la extracción.

La Unión de Países Exportadores de Banano (UPEB, 1979), afirma que con el método de propagación rápida, en la práctica no se obtienen más de 20 hijos transplantables durante el primer año de siembra y después de 2 años la máxima producción por este método es aproximadamente de 200 hijos.

Wilson (1985), utilizando la técnica de propagación rápida con el cultivar False Horn del grupo genómico *Musa* (AAB) obtuvieron promedios entre 4 y 11.8 hijos por planta después de seis meses.

Sandoval & Muller (1987), efectuando la decapitación del seudotallo arriba de su punto meristemático, lograron la formación de yemas laterales. De esta manera consiguieron más de 150 plántulas a partir de un solo cormo en un lapso de 5 a 7 meses.

Sandoval (1985), empleando la técnica de propagación rápida en el cultivo del banano logró obtener una producción de 72.8 hijos por cormo en un período de 176 días empleando el cultivar Grande Naime (AAA), así mismo obtuvo resultados muy diferentes con el cultivar Williams-Hybrid (AAA) con 9 brotes por rizoma en un período de 154 días.

2.2.3 Micropropagación (por cultivo de tejidos)

2.2.3.1 Definición

Según Sandoval *et al.* (1991), la micropropagación del banano, consiste en cultivar asépticamente ápices provenientes de hijuelos, en un medio nutritivo artificial, adicionando reguladores de crecimiento para estimular la multiplicación y obtención de plantas completas en base a la totipotencia (capacidad genética de una célula vegetal adulta de desarrollar un organismo completo mediante el proceso de regeneración) de las células vegetales.

2.2.3.2 Proceso de micropropagación

Una de las primeras etapas en el cultivo *in vitro* de cualquier planta es la desinfección del explante. Después siguen las etapas de iniciación (establecimiento aséptico del explante), multiplicación de los explantes y obtención de plantas enteras (Murashige, 1974 y Sandoval *et al.*, 1991).

La micropropagación de musáceas a través de cultivo de tejido ha sido estudiada por varios autores (Berg & Bustamante, 1974; Cronauer & Krikoriam, 1984; Banerjee & De Langhe, 1985; Gupta, 1986; Wong, 1986; Mateille & Foncelle, 1988; Molina, 1988; Pérez & Orellana 1989a y 1989b; Vuylsteke, 1989).

Muller & Sandoval (1986), afirman que con el método de cultivo de tejidos y la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo, se estimula la multiplicación y la obtención de plantas completas. Así mismo recomiendan varios factores a considerar para el éxito del cultivo *in vitro*, éstos son: fuente, tamaño, patrón de crecimiento y edad del explante, además de la posición del explante en el medio de cultivo, microambiente y totipotencialidad de las células.

Para obtener una adecuada respuesta, los explantes cultivados necesitan de ciertos requerimientos que los suple un medio de cultivo. Según Pérez & Orellana (1989b), como componentes básicos de un medio de cultivo se pueden considerar los siguientes: Macronutrientes, micronutrientes, una fuente de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento y algunas veces aminoácidos. En ocasiones se adicionan otros componentes orgánicos de naturaleza química no definida como el agua de coco (*Cocos nucifera* L.), caseína hidrolizada y extracto de malta.

En el caso específico del género *Musa* se han utilizado varios medios básicos de cultivo; sin embargo, el de más amplia aceptación es el basal de Murashige & Skoog (1962), conocido como Medio MS, en ocasiones modificado, el cual a pesar de haber sido preparado específicamente para micropropagar tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), ha sido utilizado exitosamente para una gran variedad de cultivos incluyendo al banano y plátano (Banerjee

& De Langhe 1985; Muller & Sandoval 1986; Aguilar & Reyes 1987; Pérez & Orellana 1989b; Vuylsteke 1989 y Sandoval *et al.* 1991.

Algunos investigadores (Sandoval & Muller, 1987; Smith, 1988 y Vuylsteke, 1989), incluyen antioxidantes como cisteína, ácido clorhídrico, ácido cítrico o ácido ascórbico. Además combinan medios de consistencia semi-sólida y líquida como parte de la estrategia de producción. Habitualmente incluyen los reguladores de crecimiento tipo auxinas y citocininas, los factores medio ambientales como intensidad y calidad de la luz, el fotoperíodo, la temperatura y la humedad relativa durante el período de incubación, los que tienen gran influencia en el desarrollo de los cultivos. Todas estas variables deben controlarse adecuadamente durante el proceso de micropropagación, puesto que de alguna manera, determinan el éxito o el fracaso en el uso de esta técnica.

Los cultivos *in vitro* pueden mantenerse en un rango variable de temperatura. Villalobos (1985), afirma que los explantes pueden soportar temperaturas desde 20-30 °C; al mismo tiempo refiere que el alternar precalentamientos con bajas temperaturas pueden influir en la morfogénesis.

Roca *et al.* (1992), sugiere que lo más recomendable para incubación son temperaturas entre 25-30 °C y que las temperaturas altas favorecen la rizogénesis y las bajas (8-10 °C) influyen en el crecimiento lento, siendo sin embargo su viabilidad alta cuando se requiere conservar materiales por largos períodos de tiempo.

Fitchet & Winnaar (1988), determinaron que el Hipoclorito de calcio [Ca(OCl)₂] al 10 % aplicado durante 20 minutos fue el método de descontaminación que presentó mayor efectividad en plantas de banano provenientes de campos agrícolas.

Para Banerjee & De Langhe (1985), el número de hijos a obtener en la micropropagación de musáceas va a depender de la composición genómica de los cultivares, la concentración de fitohormonas y la composición y consistencia física del medio de cultivo, así mismo afirman que los cultivares AAB presentan mayor número de hijos que los AAA. Los cultivares ABB presentan estructura bulbosa y de 10-12 meristemas en la superficie, por el contrario en los AAA ocurre la multiplicación por regeneración adventicia de pequeños vástagos con hojas originados a partir del meristemo apical original. Señalan también que el número de sub-cultivos tiene influencia sobre la tasa de proliferación; la mayoría de cultivares presentan mayor tasa de proliferación entre el tercer y sexto sub-cultivo.

Para Smith (1988), el tiempo de permanencia de las plantas bajo condiciones *in vitro* se puede determinar por el número de plántulas a obtener de cada explante. En base a esto recomienda producir de 1 000 a 20 000 plantas de cada explante con el propósito de disminuir los riesgos de variabilidad en el cultivo de banano y plátano. Así mismo, Pérez & Orellana (1989b), señalan que para disminuir el riesgo de variación somaclonal no es recomendable multiplicar el mismo explante por períodos mayores de 18 meses ó en su defecto obtener un número máximo de 16 000 explantes en sub-cultivos sucesivos a partir de un explante inicial.

2.2.3.3 Reguladores de crecimiento

Bidwel (1990), afirma que los reguladores de crecimiento o fitorreguladores

solamente son activos si logran acceder al lugar donde deben o se espera actúen; así que altas concentraciones de reguladores de crecimiento pueden mantenerse inactivas si se localizan o almacenan en compartimientos (p.e.: La vacuola) separadas de su lugar de acción. También pueden inactivarse químicamente sin destruirse, como parte del metabolismo que las enmascara.

Como reguladores de crecimiento se conocen las auxinas, citocininas, giberelinas y las sustancias retardatorias e inhibitorias (Vásquez & Torres, 1981).

Para Bidwel (1990), la auxina se forma en el ápice de los coleótilos y se mueve hacia abajo (raíces). Así mismo afirma que las auxinas actúan sobre muchos mecanismos en las plantas. Dentro de las funciones de las auxinas se pueden resumir las siguientes: Formación de órganos, organización de otros tejidos (interactúa con otros factores), estimulación de la división celular (interactúa con citocinina), alargamiento celular, relajación de la pared celular, síntesis de RNA y proteínas, dirección del transporte, efectos enzimáticos, producción de etileno, dominancia apical y prevención de la abscisión.

Las citocininas son derivados de la adenina y se forman en las raíces, siendo su movimiento ascendente a través del xilema, transportándose hacia las hojas y los tallos de las plantas (Bidwell, 1990).

Entre los efectos de la citocinina están: La formación de órganos en los tejidos cultivados *in vitro*, el alargamiento y la división celular, la prevención de la senescencia y la inducción de la floración bajo ciertas circunstancias, contrarresta el letargo y libera de la dominancia apical (Bidwell, 1990).

En la etapa de multiplicación de propágulos, Vuylsteke (1989), recomienda la

utilización de citocininas para estimular la formación múltiple de brotes o hijos. Para este propósito recomienda el 6-BAP en concentraciones de 2 a 5 mg/l.

Pérez & Orellana (1989a), haciendo una revisión de 35 diferentes medios de cultivo para la micropropagación de banano y plátano, refieren que se han usado diferentes concentraciones de auxinas y citocininas para la inducción de hijos. De esos 35 medios solo 9 han utilizado menos de 5 mg/l de 6-BAP, el resto utilizan entre 5-10 mg/l y además obtienen las mayores tasas de proliferación, esto demuestra que el uso de la citocinina es un factor determinante en la estrategia de micropropagación en las musáceas.

2.2.3.4 Ventajas y desventajas de la micropropagación

Algunas de las ventajas de la técnica de micropropagación *in vitro* es que mediante esta metodología se pueden obtener altas tasas de multiplicación. A partir de un ápice (explante inicial) es posible lograr, en el lapso de un año, varios centenares de plantas que son fuente de semilla más sana, libre de nemátodos, hongos y bacterias en comparación con aquellas obtenidas por medio de la propagación convencional. Es posible también, aunque no en todos los casos, la obtención de plantas libres de virus. Así mismo se facilita la conservación y el intercambio internacional de germoplasma (Muller & Sandoval, 1986).

Por otro lado, Vasil & Vasil (1980), comparando la micropropagación *in vitro* con los métodos tradicionales encontraron las siguientes ventajas de la micropropagación:

- 1.► Permite obtener plantas de calidad uniforme, además crecen y maduran más rápido que las propagadas tradicionalmente.

- 2.▶ Permite la obtención de material libre de plagas y enfermedades, pudiéndose producir vitro-plantas durante todo el año.
- 3.▶ Facilitan el intercambio de germoplasma a nivel internacional, sin ningún riesgo.

Berg & Bustamante (1974), afirman que uno de los mayores riesgos de la micropropagación *in vitro* reside en el hecho de propagar igualmente enfermedades de tipo vascular o sistémico (Mal de Panamá, Moko bacteriano y virus) si el propágulo inicial está contaminado. Por tal razón, recomiendan efectuar una termoterapia (inmersión de propágulos en agua caliente) previo al aislamiento del meristemo.

Durante la micropropagación puede presentarse variación somaclonal causada por diferentes factores. Smith (1988), en un artículo publicado sobre la variación genética en plantas de *Musa* propagadas a través de cultivo de tejido, afirmó que las variaciones somaclonales en éste tipo de cultivo son influenciadas por factores intrínsecos tales como la estabilidad genética del cultivar o genotipo micropropagado, y factores extrínsecos o inducidos por el cultivo; al respecto resumió los siguientes factores que influyen el nivel de variación somaclonal:

- 1.▶ La formación de callos como fase del ciclo de propagación.
- 2.▶ La prolongación del período de cultivo, lo que es lo mismo el número de sub-cultivos a que se somete a la planta en el laboratorio.
- 3.▶ Las especies de propagación asexual pueden presentar mayor frecuencia de variación somaclonal que las plantas propagadas por semilla botánica.
- 4.▶ Algunos genotipos, durante la propagación por cultivo de tejidos, son más inclinados a la inestabilidad genética que otros.

5.► La composición del medio de cultivo particularmente la naturaleza y concentración de los reguladores de crecimiento pueden inducir a cambios genéticos en las plantas propagadas por cultivo de tejidos.

Pérez & Orellana (1989a), recomiendan que todos los años deben cambiarse los meristemos ya que cuando los cultivos tienen largos períodos *in vitro* ocurre habituación y ésto se manifiesta con la activación de genes (cambio-epigenéticos) y la producción de citocininas principalmente.

En muchos países donde se ha trabajado en la micropropagación de banano se ha encontrado diversos grados de variabilidad genética en plantaciones de banano obtenidas *in vitro*. Smith (1988), reporta variabilidad genética en Taiwán (3 %), Israel (9 %), Australia (21 %) y Jamaica (25 %).

En la micropropagación del cultivo de banano, el enanismo es la más común de las variaciones somaclonales o plantas fuera de tipo, que se observa especialmente en los clones Cavendish (Smith, 1988 y Vuylsteke, 1989).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales y equipos

A continuación se detallan los materiales y equipos que fueron utilizados en el estudio tanto en las fases de campo como de laboratorio:

- | | |
|---------------------------------|---|
| -Acido clorhídrico (HCl) | -Soluciones madres (MS) |
| -Agitadores | -Frascos de plástico y vidrio |
| -Alcohol | -Horno |
| -Algodón | -Machetes |
| -Autoclave | -Marcadores |
| -Balanza analítica | -Mecheros de Bunsen |
| -Beakers | -Parafina (cintas) |
| -Papel craft | -Tubos de ensayo |
| -Calentadores electromagnéticos | -Papel de aluminio |
| -Cámara de flujo laminar | -Pinzas |
| -Cinta adhesiva | -Pipetas, -Regla milimetrada |
| -Cuchillos | -Placas petri |
| -Destilador de agua | -Potenciómetro |
| -Escalpelos y cuchillas | -Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) |
| -Hidróxido de Potasio (KOH) | -Reguladores de crecimiento (IBA, AIA, 6-BAP) |
| -Hipoclorito de Sodio (NaOCl) | -Sacarosa; Bacto Agar |

3.2 Descripción del estudio

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Programa de Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km 12 1/2 carretera norte, Managua, Nicaragua. La duración del ensayo abarcó el período comprendido entre septiembre de 1992 a enero de 1993.

Se desarrollaron dos fases, siendo la primera la de establecimiento de las yemas apicales en un medio de cultivo estéril y la segunda la de micropropagación o multiplicación *in vitro* del explante.

3.2.1 FASE I: Establecimiento del cultivo libre de patógenos

La primera fase tuvo como objetivo principal la obtención del material vegetativo estéril, el cual será utilizado para la posterior siembra *in vitro*. El proceso incluyó la selección de plantas en el campo y la posterior desinfección y establecimiento de las mismas bajo condiciones asépticas. La metodología utilizada en esta fase fue la empleada por Aguilar & Reyes (1987).

Como material inicial se utilizaron hijuelos del cultivar de banano Enano Ecuatoriano (AAA) sub-grupo Cavendish; extraídos de las áreas de producción bananeras de la hacienda "El Hular" ubicada en el departamento de Chinandega, Nicaragua.

A continuación se detalla el procedimiento general durante esta fase el cual fue subdividido en dos partes (a y b) referidas a la práctica de selección, limpieza y desinfección del material inicial.

a) En el campo

Las plantas se seleccionaron de acuerdo a su estado morfológico (grosor del tallo, número de hojas, apariencia fitosanitaria, etc.) y productivo (preferiblemente plantas con racimo bien desarrollado).

Una vez extraídos los hijuelos o yemas laterales, con ayuda de cuchillos se procedió a eliminar las capas exteriores de los cormos que recubren las yemas apicales y meristemas, hasta lograr un tamaño del cormo de 5-7 cm de altura y 10 cm de diámetro, introduciéndolos inmediatamente en agua destilada para evitar la oxidación de las paredes del cormo.

b) En el laboratorio

El material extraído en el campo se lavó con detergente común y fue enjuagado con agua destilada para eliminar los residuos de detergentes y otros materiales contaminantes de la superficie de los cormos. Una vez lavado el material se practicó una primera desinfección con una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5 % durante 10 minutos.

Con cuchillos esterilizados se eliminaron las vainas foliares del cormo hasta lograr un tamaño de 2-3 cm, con este tamaño el material se llevó a la cámara de flujo laminar, la que fue desinfectada previamente con luz ultravioleta durante 15 minutos y alcohol al 70%.

En la cámara de flujo laminar con ayuda de escalpelos y pinzas esterilizadas se eliminaron las últimas capas que recubren la yema apical, dejando el explante listo para la siembra con un tamaño de 0,5 - 1.0 cm de altura, finalmente se efectuó la segunda desinfección, esta vez con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 5 % durante 10 minutos, enjuagando abundantemente con agua destilada esterilizada para eliminar los residuos de esta sustancia.

Inmediatamente después de la segunda desinfección se procedió a efectuar la siembra o implantación en tubos de ensayo de 14.5 x 2.5 cm conteniendo 10 ml del medio de cultivo en estado líquido y utilizando papel filtro como soporte del explante. Los medios de cultivo se prepararon y esterilizaron previo a la siembra en autoclave a temperaturas de 121 °C y 1.5 atmósferas de presión durante 25 minutos. El medio de cultivo básico utilizado fue el MS, suplementado con 0.3 mg por litro de ácido indol butírico (IBA) solamente en la etapa de establecimiento.

Después de la siembra los ápices fueron trasladados a un cuarto de crecimiento donde se establecieron bajo condiciones externas reguladas con temperaturas de 25 ± 1 °C, intensidad lumínica de 2 000 lux por un período de seis semanas hasta lograr diferenciar una planta de cada ápice establecido.

3.2.2 FASE II: Micropropagación

La segunda fase fue el objeto principal de estudio donde se utilizaron diferentes niveles de reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) y consistencia del medio de cultivo (semi-sólido y líquido) durante tres sub-cultivos, a fin de obtener la combinación de estos factores que conduzcan a la óptima proliferación de hijos y el menor riesgo de variabilidad somaclonal.

En esta fase se determinó los medios de cultivo (tratamientos) que mejor respuesta tienen sobre la óptima proliferación de hijos en el cultivar de banano Enano Ecuatoriano (AAA), considerando la influencia de la consistencia física del medio de cultivo, la combinación y concentración de reguladores de crecimiento y el número de sub-cultivos o pases.

Para el inicio del estudio se utilizaron las plántulas obtenidas en la fase anterior, seleccionando los explantes con mejor apariencia. Estas plántulas fueron limpiadas de tejidos necróticos y reducidas de tamaño hasta 0.5 y 1 cm de altura; este proceso se realizó en la cámara de flujo laminar con ayuda de pinzas y escalpelos esterilizados.

Una vez preparado los explantes, éstos fueron establecidos en el medio de cultivo basal (preparado como se indica posteriormente) al cual se adicionaron los niveles de reguladores de crecimiento para cada tratamiento o variante de cultivo en estudio. La siembra se realizó en frascos de 10 cm de alto por 8 cm de diámetro conteniendo 30 ml del medio en estado semi-sólido y 15 ml en el caso del medio líquido.

El medio basal empleado fue el utilizado por Murashige & Skoog (1962), denominado en lo sucesivo medio MS y los niveles de reguladores de crecimiento se detallan en la Tabla 1.

3.2.2.1 Formulación y preparación del medio basal

El medio basal MS está compuesto por una serie de sales inorgánicas y sustancias orgánicas, diluidas en soluciones conocidas como soluciones madres. En la Tabla 1 se muestra la composición y volúmenes utilizados en la preparación de un litro de medio basal (CIAT, 1980.)

Tabla 1. Composición del medio de cultivo básico (MS) utilizado en la micropropagación de *Musa*.

Componentes	Cantidad por litro		Molaridad	Volumen	
	En peso				
1.	NH ₄ NO ₃	1650.0	mg	20.6 mmol	
	KNO ₃	1900.0	mg	18.8 mmol	
	MgSO ₄ .7 H ₂ O	370.0	mg	1.50 mmol	
	KH ₂ PO ₄	170.0	mg	1.25 mmol	20 ml/l
2.	H ₃ BO ₃	6.2	mg	100.0 umol	
	MnSO ₄ .4 H ₂ O	22.3	mg	100.0 umol	
	ZnSO ₄ .7 H ₂ O	8.6	mg	29.9 umol	
	Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.25	mg	1.03 umol	
	CuSO ₄ .5 H ₂ O	0.025	mg	0.10 umol	
	CoCl ₂ .6 H ₂ O	0.025	mg	0.10 umol	1 ml/l
	3.	KI	0.83	mg	5.00 umol
4.	CaCl ₂ .2 H ₂ O	440.0	mg	2.99 mmol	2.9 ml/l
5.	Na ₂ EDTA.2 H ₂ O	37.4	mg	100.00 umol	
	FeSO ₄ .7 H ₂ O	27.8	mg	100.00 umol	5 ml/l
6.	Tiamina-HCl	0.1	mg	0.29 umol	10 ml/l
7.	M-Inositol	100.0	mg	555.00 umol	12.5 ml/l

- MS (Murashige y Skoog, 1962) ; mmol= milimol; umol= micromol

- El pH se ajusta a 5.8 empleando Acido clorhídrico o Hidróxido de Potasio, esto se comprueba con el uso de un potenciómetro.

- Los constituyentes de la solución madre N°1 se disuelven en 300 ml de agua; los de la solución madre N°2, 3 y 4 en 100 ml; los N°5 y 6 se disuelven en 200 ml. La solución madre N°7 ya está diluida.

Además de los nutrientes que componen el medio basal se adicionó sacarosa como fuente de carbono a razón de 3 % (30 gr/l) y en los medios de consistencia semi-sólida se incorporó bacto agar al 0.7 % (7 gr/l).

Según el CIAT (1980), se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones para la preparación del medio de cultivo.

- 1.- Por regla general, los macronutrientes inorgánicos del medio basal deben proveer al tejido por lo menos de 25 mmol de nitrato (NO_3) y potasio (K) y no más de 8 mmol de amonio (NH_4). Los niveles de $\text{NO}_3 + \text{NH}_4$ no deben llegar a 60 mmol.
- 2.- El Ca, SO_4 y Mg deben encontrarse en una cantidad de 1-3 mmol; el Fe debe agregarse preferiblemente como quelatos de Fe. Los micronutrientes adicionados al medio basal son: Iodo (I), boro (B), hierro (Fe), manganeso (Mn), zinc (Zn), molibdeno (Mo), cobre (Cu) y cobalto (Co).

La preparación del medio basal (MS) consiste en disolver uno, a uno, todos los ingredientes de la Tabla 1, en los volúmenes de agua que se presentan al final de la misma. Varios nutrientes están contenidos en soluciones madres y sólo las sustancias inestables se preparan solas; los reactivos que puedan precipitarse no se mezclan; si los ingredientes no se disuelven bien (ejemplo las vitaminas) deben calentarse ligeramente.

La solución madre N°5 (la fuente del Fe) se prepara disolviendo primero $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 50 ml de agua; separadamente se disuelve el Na_2EDTA en 50 ml de agua, calentando un poco a baño maría; se mezclan luego ambas soluciones; se agitan bien y dejan enfriar; ya frías se completa con agua hasta obtener 200 ml en total.

Las soluciones madres N°2 y 5 se deben guardar congeladas; todas las otras se guardan refrigeradas. La solución N°6, una vez preparada debe ser usada en el lapso de 1 a 2 meses; las otras pueden mantenerse hasta 4-5 meses.

Una vez preparada las cantidades necesarias para la obtención del medio basal, se adicionaron a ésta solución los reguladores de crecimiento de acuerdo a las variantes en estudio y finalmente se ajustó el pH a 5.8, (CIAT, 1980).

En la Figura 1 se muestra un esquema que resume el proceso de micropropagación desarrollado en el presente estudio.

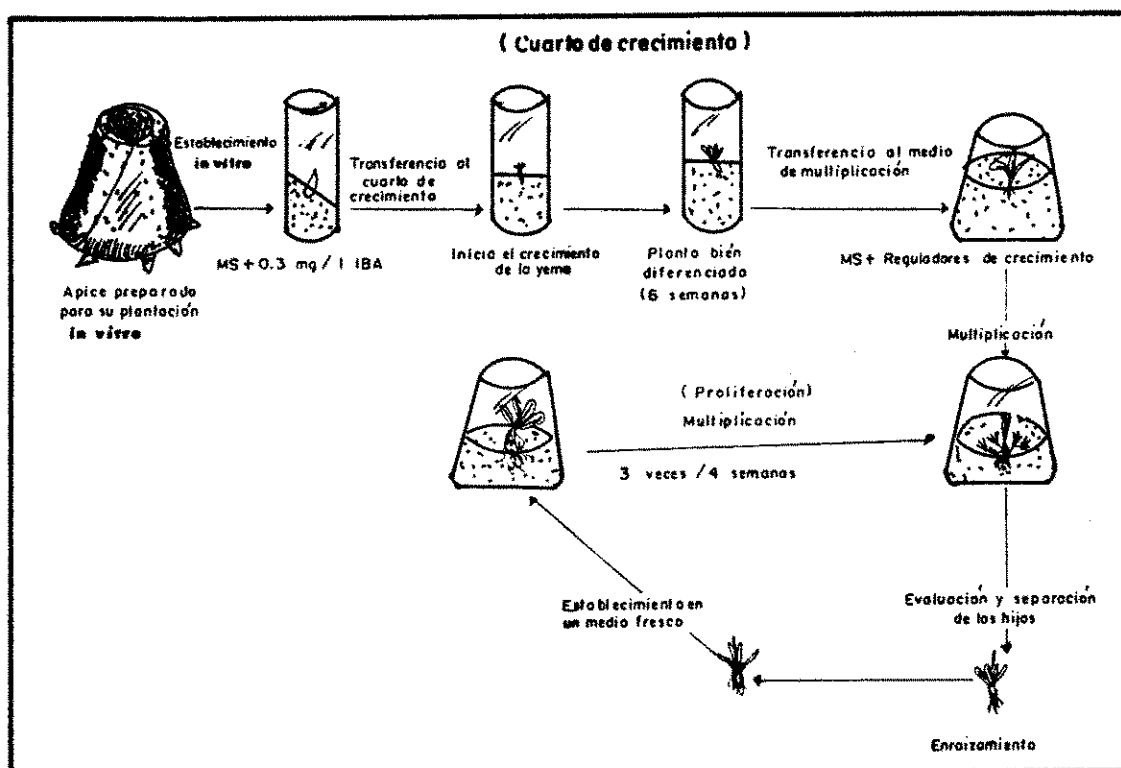


Figura 1. Esquema del proceso de multiplicación de yemas apicales de banano mediante la técnica de micropropagación.

3.3 Diseño utilizado

Se organizaron los tratamientos en un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), con tres factores en estudio y se realizó un Análisis de varianza (ANDEVA) y Separación de medias empleando la Prueba de rangos múltiples de Student-Newman-Keuls (S.N.K.) al 5%, de acuerdo a metodología sugerida por Pedroza (1993). Los niveles para cada factor en estudio son los siguientes:

Factor A: Acido indol acético (AIA)

Niveles del factor A: $A_1 = 0 \text{ mg/l}$

$A_2 = 1 \text{ mg/l}$

Factor B: 6 Bencil amino purina (6-BAP)

Niveles del factor B: $B_1 = 5 \text{ mg/l}$

$B_2 = 7 \text{ mg/l}$

$B_3 = 10 \text{ mg/l}$

Factor C: Consistencia del medio de cultivo (CDM)

Niveles del factor C: $C_1 = \text{Medio semi-sólido}$

$C_2 = \text{Medio líquido}$

El total de tratamientos en estudio fueron 12 (Tabla 2). Cada tratamiento constó de 16 repeticiones, utilizándose frascos del tipo Magenta (marca de fábrica) en los que se establecieron 4 plantas por frasco. El número de plantas total utilizado al inicio de cada sub-cultivo fue de 192 plantas.

Tabla 2. Arreglo de los tratamientos en estudio según las concentraciones de reguladores de crecimiento y la consistencia física del medio de cultivo.

Tratamiento	Concentración de reguladores de crecimiento		Consistencia física del medio
	AIA (mg/l)	6-BAP (mg/l)	
1-S	0	5	Semi-sólido
2-S	0	7	Semi-sólido
3-S	0	10	Semi-sólido
4-S	1	5	Semi-sólido
5-S	1	7	Semi-sólido
6-S	1	10	Semi-sólido
1-L	0	5	Líquido
2-L	0	7	Líquido
3-L	0	10	Líquido
4-L	1	5	Líquido
5-L	1	7	Líquido
6-L	1	10	Líquido

AIA = Acido indol acético 6-BAP = 6 Bencil amino purina
 S = Semi-sólido L = Líquido

Estos mismos tratamientos se repitieron en tres sub-cultivos. Llámese sub-cultivo o pase a la actividad que se realizó periódicamente en la cámara de flujo laminar sobre el material establecido *in vitro*, con el objetivo de seccionarlo o dividirlo y sembrar los nuevos brotes en medio de cultivo fresco para su multiplicación. Esta operación se efectuó cada 4 semanas o 28 días, concluyendo un sub-cultivo después de este lapso de tiempo.

3.4 Variables evaluadas

Se evaluaron seis variables durante la fase de micropropagación, esta actividad se realizó después de cada sub-cultivo (cada cuatro semanas) procediendo posteriormente al re-establecimiento en un medio fresco bajo las mismas condiciones hasta finalizar el siguiente período o sub-cultivo. Las variables evaluadas y metodología empleada se detallan a continuación.

3.4.1 Número de hijos por planta

Se efectuó el conteo sobre el número de hijos que presentó cada explante y se obtuvo el promedio de éstos por tratamiento y por sub-cultivo. Se consideró como hijos a cada uno de los brotes que se diferenciaron a partir del explante establecido inicialmente.

3.4.2 Presencia de multiyemas

Se consideraron multiyemas a todos aquellos brotes que presentaron un conjunto de hijos o yemas no diferenciadas y de difícil conteo.

3.4.3 Altura de planta

Esta variable se midió en milímetros (mm). La medición se hizo de acuerdo a lo recomendado por Pérez & Soto (1989), considerándose la distancia desde la base del cormo hasta la base de la "V" que forman las dos últimas hojas.

3.4.4 Peso de los hijos por planta

Se midió el peso de el grupo de hijos que se formaron a partir del explante establecido, anotando el peso promedio de los hijos por planta; el pesado se realizó en una balanza analítica de alta precisión y se expresó en miligramos (mg). Cabe señalar que solamente se consideró el peso húmedo de los explantes, debido a que era necesario utilizarlos en los siguientes sub-cultivos.

3.4.5 Número de raíces por planta

Se contabilizó el número de raíces que se lograron desarrollar en cada uno de los explantes establecidos, siendo considerada solamente las raíces con tamaños mayores o iguales a 5 mm.

3.4.6 Longitud de raíces por planta:

La longitud de raíces se midió en milímetros (mm), obteniéndose el promedio de la longitud de raíz por explante.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Murashige (1974) sugiere tres etapas en el proceso de micropropagación; primeramente el establecimiento del cultivo estéril (etapa I), la multiplicación del cultivo establecido (etapa II) y la preparación para el re-establecimiento en el suelo (etapa III).

En el presente ensayo se logró estudiar las primeras dos etapas, o sea el establecimiento del cultivo estéril (hongos y bacterias) y la multiplicación masiva del cultivo establecido obteniéndose los siguientes resultados:

4.1 FASE I : Establecimiento del cultivo *in vitro*

Una vez efectuado todo el procedimiento para el establecimiento del explante en el medio de cultivo artificial y después de transcurridas seis semanas, se procedió a extraer los explantes y evaluar el grado de adaptación a las condiciones de cultivo aséptico.

De los 240 ápices establecidos *in vitro*, la mayoría se desarrollaron satisfactoriamente bajo condiciones asépticas; un 85 % de plantas logró la adaptación a las nuevas condiciones de cultivo, el 15 % restante fueron descartadas debido a problemas de contaminación, fenolización de las paredes del cormo o sencillamente por no haberse adaptado (Tabla 3). Al final de esta etapa se seleccionó el material que fue utilizado en la posterior etapa de multiplicación de los explantes.

Tabla 3. Resultados obtenidos al final de la etapa de establecimiento *in vitro* de ápices caulinares del clon de banano Enano Ecuatoriano (*Musa sp.*) (AAA).

Total de explantes introducidos <i>in vitro</i>	Causas y cantidad de cormos descartados									Explantes adaptados <i>in vitro</i>	
	Infección por bacterias	‡	Infección por hongos	‡	Cormos ennegrecidos	‡	Cormos muertos "Otras causas"	‡	Cormos descartados (‡)	Total	‡
240	7	3	14	6	10	4	5	2	15	204	85

De los 204 explantes establecidos asépticamente se utilizaron 192 para iniciación de la siguiente etapa con el sub-cultivo I. En el resto de sub-cultivos se utilizaron explantes obtenidos a partir del sub-cultivo anterior.

A pesar de que los explantes fueron desinfectados con el propósito de alcanzar condiciones asépticas, la rutina de desinfección efectuado no fue totalmente efectiva, presentándose contaminación endógena de los medios de cultivo por bacterias de un 3 %, lo cual es considerablemente bajo en comparación con los resultados que Surga & Guevara (sf.) obtuvieron trabajando en la misma etapa con los clones Poyo y Giant Cavendish.

El porcentaje total de plantas que no se lograron desarrollar fue de 15 %, sin embargo, podría considerarse como exitoso en comparación con los resultados reflejados por Surga & Guevara (sf.), quienes observaron contaminación en esta etapa de hasta el 50 %. Esta etapa es muy delicada y lleva consigo un alto riesgo de contaminación del medio de cultivo por hongos y bacterias y que pueden afectar considerablemente la calidad sanitaria y la cantidad final de material establecido asépticamente.

La contaminación fungosa, que fue del 6 %, se debió probablemente a hongos que se encontraban en el ambiente al momento de la siembra de los explantes en los medios de cultivo, pero también es posible que el material de siembra haya causado este problema, lo que es común cuando se emplean explantes muy grandes para la siembra, como los que se utilizaron en este estudio (0.5 - 1.0 cm). La influencia del tamaño de los explantes sobre la contaminación de los cultivos fue referida por Muller & Sandoval (1986) y Surga & Guevara (sf). Estos últimos evaluaron la contaminación bacteriana y fungosa de los medios de cultivo y recomiendan emplear explantes de 1 mm, para los que reportan

porcentajes de contaminación menores del 15 %, para este caso en los clones Poyo y Giant Cavendish. Además en este mismo estudio, señalan que con el empleo de explantes de 3 mm la contaminación puede llegar a ser hasta del 47 %, aumentando hasta el 90 % en explantes de 10 mm. Sin embargo, en el presente estudio con el uso de explantes de 5 - 10 mm, el porcentaje de contaminación apenas fue del 9 %, incluyendo la causada por hongos y bacterias, con lo que se reafirma el éxito obtenido en esta etapa en el presente estudio.

Los explantes contaminados tanto por hongos, bacterias o por ambos, fueron retirados y descartados, sin embargo, según Vuylsteke (1989), éstos pueden ser utilizados nuevamente efectuando una desinfección con antibióticos comerciales del tipo Cefotaximum (Cefaloxporina) y Carbenicillin (Sal sódica de A-Carboxibencilpenicilina) a concentraciones de 150 mg/l y 1 000 mg/l respectivamente.

La contaminación puede disminuirse aún más, aumentando las medidas de asepsia dentro y cerca de la sala de transferencia, así como garantizando una esterilización más cuidadosa de instrumentos, medios de cultivo, envases y la desinfección del área de transferencia y del operario (técnico que realiza la siembra); también es aconsejable emplear explantes de menor tamaño para la siembra inicial, de ser posible meristemas apicales con algunos primordios foliares.

Para garantizar una mejor desinfección inicial de los cormos Fitchet & Winnaar (1988), recomiendan utilizar hipoclorito de calcio al 10 % en vez del hipoclorito de sodio al 5 %, así mismo aumentar de 10 a 20 minutos, el tiempo de inmersión de los explantes en el desinfectante.

En cuanto a la fenolización (oscurecimiento de las paredes del cormo) de los explantes, a pesar de que se observó claramente este fenómeno, las pérdidas de material (explantes) no fueron considerables, puesto que solamente un 4 % de éstos fueron descartados por esta causa. En los medios de cultivo de consistencia semi-sólida fue mas evidente la manifestación de el ennegrecimiento producto de la fenolización, sin embargo en la mayoría de los casos solo causó muerte parcial de los tejidos, siendo reutilizados los explantes después de una limpieza de los tejidos necróticos y solamente en el caso de una afección severa, que fueron muy pocas (4 %), se procedió a eliminar los explantes, ya que además se observaban débiles. No se observó relación entre la fenolización y la contaminación de los explantes.

El ennegrecimiento de los explantes se disminuyó a medida que se aumentó el número de sub-cultivos y en la medida que se fueron eliminando los tejidos necróticos. Caplin (1963), afirma que el ennegrecimiento se debe a la presencia de sustancias fenólicas y polifenólicas que oxidan las paredes del cormo y que pueden difundirse hacia el medio de cultivo, especialmente si se cultivan secciones de fruto y yemas apicales como es el caso de este estudio.

De el total de explantes establecidos *in vitro* en esta etapa, un 2 % (5 explantes) se descartaron debido a causas no determinadas o reconocidas en este estudio y diferentes a las mencionadas anteriormente, razón por la que se empleó el término de "otras causas". Sin embargo, al parecer lo que dominó en este caso, fue la no adaptación de los explantes a las nuevas condiciones de cultivo produciéndose "stress" (respuesta fisiológica negativa ante las nuevas condiciones de cultivo), ahogamiento y finalmente muerte del explante, así

mismo es probable que el estado fisiológico de los explantes afectados no haya sido el ideal al momento de la implantación lo que pudo haber afectado su adaptación y provocado su muerte.

4.2 FASE II: Micropropagación

4.2.1 Número de hijos

En los Anexos I, II y III, se presentan los valores promedios del número de hijos por explante obtenidos, en los que se refleja que existen diferencias significativas entre los tratamientos estudiados en los tres sub-cultivos.

En el primer sub-cultivo el tratamiento que indujo el mayor número de hijos fue el 6-S (MS + 1 mg/l AIA + 10 mg/l 6-BAP) con una tasa de proliferación de 4.5 hijos/planta. En segundo lugar se agrupan los tratamientos 2-S (MS + 0 mg/l AIA + 7 mg/l 6-BAP), 3-S (MS + 0 mg/l AIA + 10 mg/l 6-BAP), 5-S (MS + 1 mg/l AIA + 7 mg/l 6-BAP) y 4-S (MS + 1 mg/l AIA + 5 mg/l 6-BAP), entre los cuales no existen diferencias estadísticas significativas y que inducen promedios de 4.25, 4.13, 3.81 y 3.63 hijos/planta respectivamente (Figura 2).

Los más bajos resultados obtenidos en el primer sub-cultivo se presentaron en los tratamientos 5-L con 2.13 hijos/planta y el tratamiento 6-L que produjo 1.55 hijos/planta.

En el segundo sub-cultivo el tratamiento 2-S (MS + 0 mg/l AIA + 7 mg/l 6-BAP) fue estadísticamente superior en cuanto a la producción de hijos con 3.68 hijos/planta, seguido por el tratamiento 6-S con 3.19 hijos/planta. En cambio, el tratamiento que

presentó el menor número de hijos fue el 2-L (MS + 0 mg/l AIA + 7 mg/l 6-BAP) con un promedio de 1.41 hijos/planta (Figura 2).

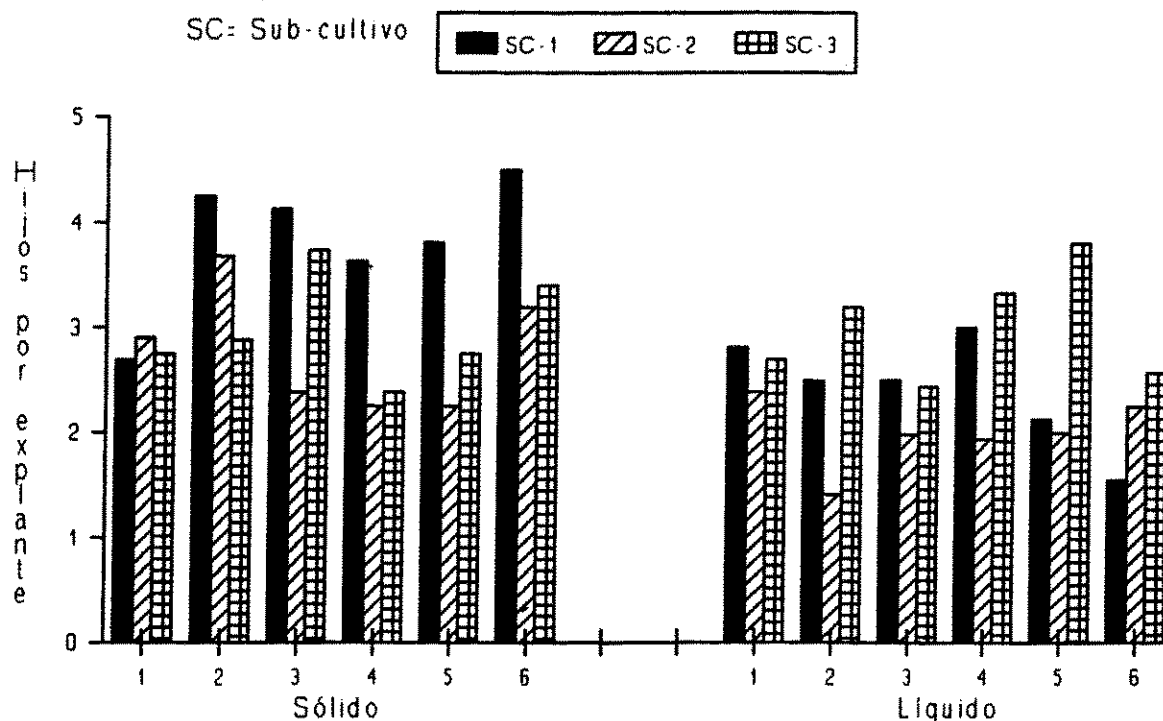


Figura 2. Número promedio de hijos por explante y tratamiento obtenidos en el cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos.

En el tercer y último sub-cultivo el tratamiento 5-L (MS + 1 mg/l AIA + 7 mg/ 6-BAP) fue el que presentó el mayor número de hijos con un promedio de 3.81 hijos/planta, siendo estadísticamente superior al resto de tratamientos.

Las variantes de medios de cultivo 6-S (MS + 1 mg/l AIA + 10 mg/l 6-BAP), 4-L (MS + 1 mg/l AIA + 5 mg/l 6-BAP) y 2-L (MS + 0 mg/l + 7 mg/l 6-BAP), también presentaron buenos resultados siendo estadísticamente similares entre sí con promedios de 3.4, 3.33 y 3.19 hijos/planta respectivamente. En este sub-cultivo el tratamiento que indujo

a la menor producción de hijos fue el 4-S (MS + 1 mg/l AIA + 5 mg/l 6-BAP) con 2.38 hijos/planta.

Al hacer el análisis del número de hijos por planta en los diferentes medios de cultivo al final de los tres sub-cultivos estudiados, se observó que la tasa promedio de proliferación de hijos se vio influenciada principalmente por la consistencia física del medio de cultivo y en menor medida por el efecto e interacción de los reguladores de crecimiento y el número de sub-cultivos.

En la Figura 3, se presenta el número de hijos promedio (tasa de proliferación) obtenido al final de los tres sub-cultivos. Es claro que en los medios de consistencia semi-sólido se obtuvieron mayores tasas de proliferación de hijos, este comportamiento se refleja en todas las variantes de reguladores de crecimiento estudiadas. Al parecer, los medios de cultivo semi-sólido proporcionan adecuadas condiciones para el sostén de las plantas desde el inicio de su implantación, ya que éstas no necesitan invertir energía, nutrientes y reguladores de crecimiento en el desarrollo de órganos de anclaje (raíces). De esta manera la planta da prioridad al desarrollo de las yemas que originarán la nueva descendencia. Por el contrario, cuando se establecen las plantas en medios de consistencia líquida, los tejidos, al no contar con un soporte adecuado, promueven el desarrollo y crecimiento de raíces poco tiempo después de haber sido establecidos en el medio de cultivo, en lo que se consume buena parte de nutrientes y reguladores de crecimiento, disminuyendo la disponibilidad de éstos y por consiguiente la inducción a la proliferación de hijos.

De las variantes de medios de cultivo semi-sólido, los tratamientos en los que se combinaron 1 mg/l AIA + 10 mg/l 6-BAP (6-S) y 0 mg/l AIA + 7 mg/l 6-BAP (2-S),

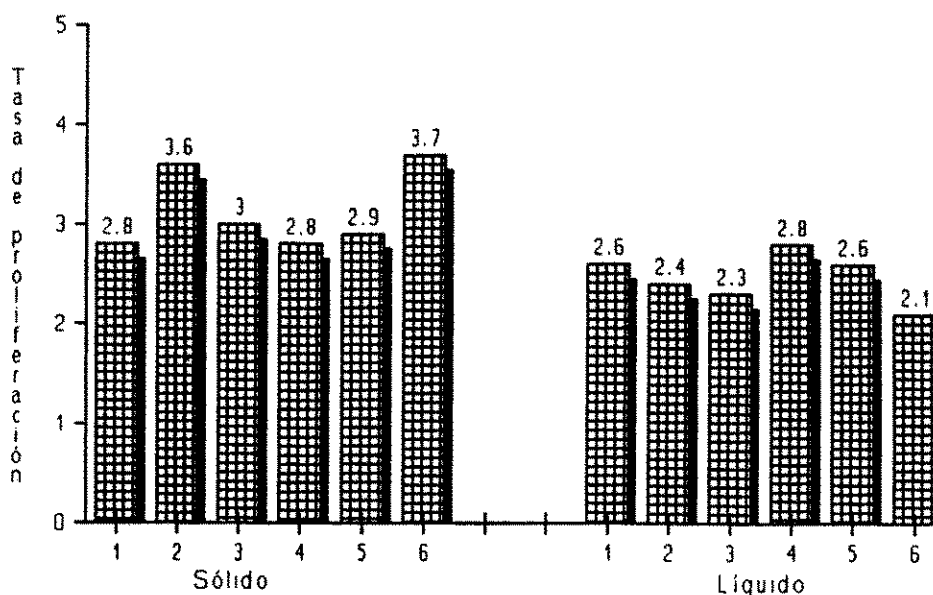


Figura 3. Tasa de proliferación por explante en tres sub-cultivos *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA).

presentaron las mayores tasas de proliferación de hijos. En el tratamiento 6-S se combinó un nivel alto (10 mg/l) de 6-BAP con un nivel medio de AIA (1 mg/l) lo que al parecer provocó una interacción sinérgica de los reguladores de crecimiento que indujo a la proliferación de hijos. Con el tratamiento 2-S se obtuvieron resultados similares a los obtenidos cuando se utilizó el mayor nivel de 6-BAP a pesar de haber reducido el nivel de 6-BAP a 7 mg/l y no adicionar auxina al medio de cultivo; en este caso la brotación de yemas fue influenciada tanto por la consistencia del medio de cultivo, como por el nivel de citocinina puesto que no se adicionó AIA. En base a éstos resultados, podría deducirse que el uso de las auxinas no es necesario en la etapa de multiplicación de los explantes, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Mateille & Foncelle (1988), con el clon de

banano Poyo (AAA), y con los estudios desarrollados en Cuba por Pérez & Orellana (1989a) en 10 clones de banano.

La relación entre la proliferación de hijos y el número de sub-cultivos en plantas de *Musa* micropropagadas *in vitro*, ha sido reportado por varios autores (Banerjee & De Langhe, 1985; Rodríguez *et al.* 1987; Sandoval *et al.* 1991)

Banerjee & De Langhe (1985) encontraron una ligera tendencia al incremento en el número de hijos por planta en 5 sub-cultivos consecutivos y 8 cultivares de bananos y plátanos con el aumento de los sub-cultivos. Lo anterior, no concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio puesto que no se observó una tendencia de incremento del número de hijos por planta al aumentar el número de sub-cultivos. Sin embargo, coincide con Rodríguez *et al.* (1987) y con Sandoval *et al.* (1991), quienes obtuvieron un número irregular de hijos por planta en igual número de sub-cultivos en la micropropagación de dos clones de banano y dos de plátano.

Según Rodríguez *et al.* (1987), las diferencias en cuanto a la proliferación de hijos entre los sub-cultivos podrían ser causadas por la presencia de hijos con diferente morfología y capacidad organogénica (capacidad de un tejido no diferenciado, de iniciación de estructura y/o función de un órgano), definiendo tres tipos de individuos: Los que se producen a partir de yemas laterales, los que son una continuación del crecimiento del tallo decapitado y los que se forman a partir de yemas adventicias. Estas últimas pueden producir un gran número de hijos, sin embargo su uso en la micropropagación comercial no se recomienda debido a que han sido reportadas por Pérez & Orellana (1989b) y Smith & Hamill (1990), como promotoras del desarrollo de variación somaclonal (cambios

en la composición cromosómica del nuevo organismo en relación a los progenitores o material parental) entre las plantas micropropagadas.

Además, Rodríguez *et al.* (1987), señalan que plantas con diferentes edades pueden coexistir en un mismo sub-cultivo, de tal forma que es posible distinguir fácilmente entre el explante inicial (madre), el explante hijo y los nietos. Los explantes que han sido madre en sub-cultivos anteriores tienen la tendencia a producir mayor número y desarrollo de hojas, así como también un mayor número de raíces y además son más altos. Los considerados como hijos desarrollan mayor número de brotes, pero éstos son más pequeños y con pocas hojas y raíces.

Para efectos de la selección del mejor tratamiento en relación a la producción de hijos, se calculó la tasa promedio de proliferación (Figura 3), con la cual podría hacerse una proyección potencial del número de hijos a producirse en un determinado período de tiempo.

En este estudio a pesar de no haber coincidido con la máxima tasa de proliferación reportada por Vuylsteke & De Langhe (1984) y por Banerjee & De Langhe (1985), con promedios entre 16.0 hijos por planta en un cultivar de banano (AAA) y 39.7 en un cultivar de plátano (AAB); se obtuvieron resultados que coinciden con los reportados por Damasco & Barba (1984); Jarret, (1985), Aguilar & Reyes (1987), Rodríguez *et al.* (1987), Pérez & Orellana (1989a), Cote *et al.* (1990) y Sandoval *et al.* (1991); quienes trabajando con diferentes clones de banano y plátano encontraron tasas de proliferación de entre 1.5 y 7 hijos por planta.

Cuando el objetivo es preparar las plantas para su posterior adaptación a condiciones de campo, la utilización de los medios de cultivo de consistencia líquida son los más adecuados, porque en ellos se desarrollan plantas con mayor altura, peso, número y longitud de raíces (Figuras 9, 10 y 11); condiciones que según Pérez & Orellana (1989a), favorecen la posterior adaptabilidad de la plántula a condiciones de vivero.

La utilidad de los resultados obtenidos, es tal, que se puede afirmar que todas las variantes o tratamientos estudiados permitieron obtener tasas de proliferación que superan la que de ordinario se obtiene por el método de propagación tradicional, independientemente de la concentración de reguladores de crecimiento empleados y la consistencia del medio de cultivo, por lo que es posible producir masivamente vitroplantas aún con los niveles más bajos de reguladores de crecimiento en estudio (0 mg/l AIA y 5 mg/l 6-BAP).

4.2.2 Presencia de multiyemas

Las multiyemas son consideradas un factor de inestabilidad genética; según Pérez & Orellana (1989b) y Smith & Hamill (1990), éstas se forman a partir de yemas adventicias las cuales a su vez se han desarrollado a partir de una sola célula, que puede ser del cambio basal o de callos de cicatrización, que se forman sobre los cortes realizados a las plántulas *in vitro* para multiplicarlas.

En el primer sub-cultivo no se observó la formación de multiyemas en ninguno de los tratamientos estudiados lo cual concuerda con lo expresado anteriormente por Pérez &

Orellana (1989b), en relación al número de cortes, ya que fue a partir del segundo sub-cultivo cuando comenzó a observarse la formación de multiyemas.

En los anexos II y III y en la Figura 4, se presentan los valores promedios del número de multiyemas en los diferentes tratamientos y sub-cultivos estudiados. Como se observa, las multiyemas se presentaron a partir del segundo sub-cultivo.

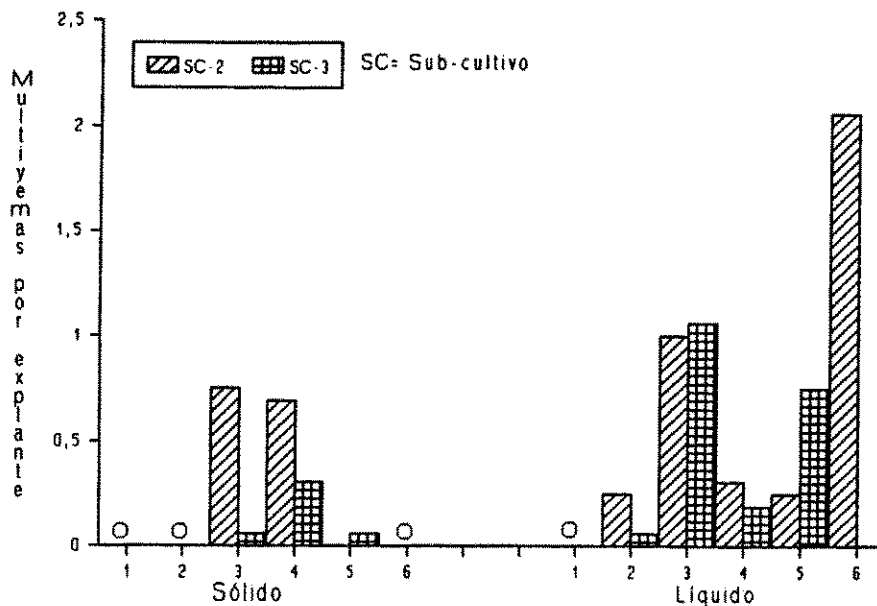


Figura 4. Número promedio de multiyemas obtenidas en el cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos.

Tanto en el sub-cultivo II como en el III, se sembraron explantes cuyos cormos presentaban cortes producidos al ser separados de las macollas obtenidas en el primer sub-cultivo, a diferencia del primer sub-cultivo en el que los explantes establecidos presentaban

cortes principalmente en las partes aéreas, lo cual no provocó el desarrollo de las multiyemas.

La mayor inducción a la formación de las multiyemas se produjo en los medios en que se adicionó 10 mg/l de 6-BAP (Trat. 3-S, 3-L y 6-L), siendo notoria en éstos tratamientos la influencia de las altas concentraciones de 6-BAP; la formación de este tipo de crecimiento, ha sido reportada por varios autores (Smith, 1988; Pérez & Orellana, 1989a y Vuylsteke, 1989) como promotor de variabilidad genética.

El estado físico del medio de cultivo también influyó de forma indirecta sobre la variabilidad. Pérez & Orellana (1989b), reportan que el medio sólido favorece la formación de yemas adventicias y los medios líquidos las axilares. Lo anterior no coincide con nuestro estudio, ya que la mayor inducción a la formación de multiyemas se observó en los medios de consistencia líquida, específicamente en los tratamientos 6-L y 3-L, donde además de utilizar niveles altos de 6-BAP, se empleó un medio de cultivo de consistencia líquida.

Es probable que el empleo de auxina en el tratamiento 6-L haya favorecido la formación de multiyemas producto de un efecto inhibitor sobre la organogénesis, lo que coincide con lo referido por el CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical) (1980), que afirma que las auxinas en concentraciones medias y altas actúan sinérgicamente con las citocininas sobre la formación de callos, bloqueando el desarrollo de estructuras bien diferenciadas.

Es importante señalar que para el conteo del número de hijos en el presente estudio no se consideraron las multiyemas formadas en los diferentes tratamientos y sub-cultivos. No obstante si se decidiera incluir en este conteo cada una de las yemas que conforman la

multiyema, obtendríamos un número de hijos mucho mayor a los reportados para los tratamientos en los que se presentaron las mismas.

El excluir a las multiyemas como hijos en este estudio, se hizo con el propósito de diferenciar los tratamientos que inducían su formación para evitar de esta forma, su posterior empleo en trabajos de propagación clonal para la obtención de semilla, considerando las recomendaciones que al respecto hacen algunos investigadores (Vuylsteke & De Langhe, 1984; Pérez & Orellana, 1989b y Vuylsteke, 1989).

En la literatura citada, el estudio de las características de plantas producidas a partir de multiyemas, únicamente fue reportado por Pérez & Orellana (1989b), por lo que sería de mucho interés su estudio tanto en laboratorio como su evaluación en el campo con fines de mejoramiento genético ó propagación comercial en dependencia de la variabilidad o estabilidad del genoma en los tratamientos en donde se presentaron.

4.2.3 Altura de planta

En la Figura 5, se muestran los resultados obtenidos para la altura de plantas en los diferentes tratamientos y sub-cultivos estudiados.

En el primer sub-cultivo las plantas de mayor altura se presentaron en el tratamiento 5-L con 21.31 mm. En segundo orden se encuentran los tratamientos 1-L, 2-L, 3-L, 4-S, 4-L y 6-L con promedios entre 18.14 mm para el tratamiento 3-L y 14.92 mm para el tratamiento 6-L, entre los cuales no existen diferencias significativas. En este sub-cultivo las plantas de menor tamaño se produjeron en el medio 3-S con una altura promedio de

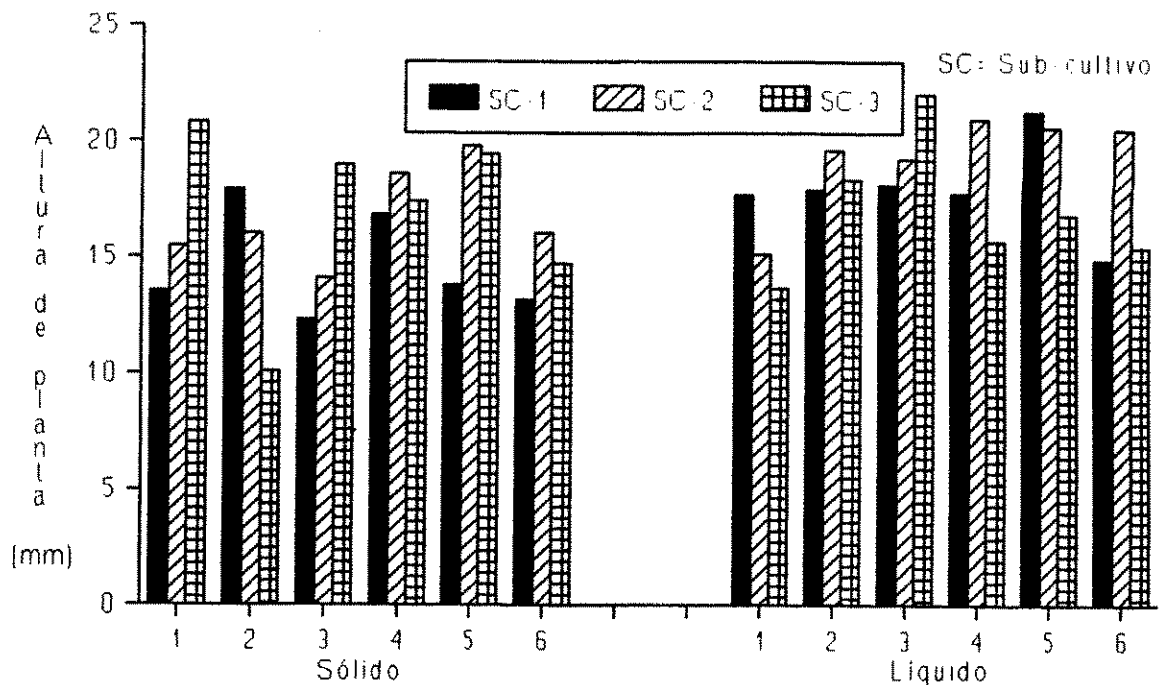


Figura 5. Altura promedio (mm) por explante y tratamiento obtenida en el cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos.

12.31 mm por explante.

El segundo sub-cultivo no mostró diferencias significativas en la altura de las plántulas (Anexo II) entre los diferentes tratamientos en estudio. La altura promedio de las plántulas varió entre 20.99 mm para el valor más alto correspondiente al tratamiento 4-L y 14.10 mm para el tratamiento 3-S que presentó las plántulas de menor altura en este sub-cultivo.

Un comportamiento bastante parecido al del sub-cultivo anterior presentaron las plántulas durante el tercer sub-cultivo en relación a la variable altura, en el que solamente entre los tratamientos 3-L y 2-S se presentaron diferencias significativas para la altura de

planta con promedios entre 22.06 y 10.08 mm respectivamente.

El comportamiento observado en los sub-cultivos II y III es probable que esté relacionado con una cierta habituación del material a la adición de reguladores de crecimiento, lo cual ha sido referido por Pérez & Orellana (1989b); pero también es posible que las condiciones de crecimiento influyan sobre la estabilización del crecimiento principalmente a partir del segundo sub-cultivo e independientemente de la combinación y concentración de reguladores de crecimiento empleados.

4.2.4 Peso de los hijos

En la Figura 6, se muestra el peso promedio de hijos por explante obtenido en los tres sub-cultivos efectuados.

Los tratamientos que acumularon los mayores pesos en el sub-cultivo I, fueron aquellos establecidos en medios de cultivo de consistencia semi-sólida, siendo éstos el 1-S, 2-S, 3-S, 4-S y 5-S con promedios entre 1 459 mg para el tratamiento 1-S y 1 722 mg para el tratamiento 5-S; sin embargo entre éstos tratamientos no se presentaron diferencias estadísticas significativas (Anexo I).

En el segundo sub-cultivo las plantas de mayor peso se presentaron en el tratamiento 6-L con 1 240 mg, seguido por el tratamiento 3-L con 1 152 mg. En este sub-cultivo las plantas que presentaron la menor ganancia en peso se presentaron en el tratamiento 3-S con 463 mg.

Los resultados obtenidos para el peso de las plantas durante el tercer sub-cultivo no

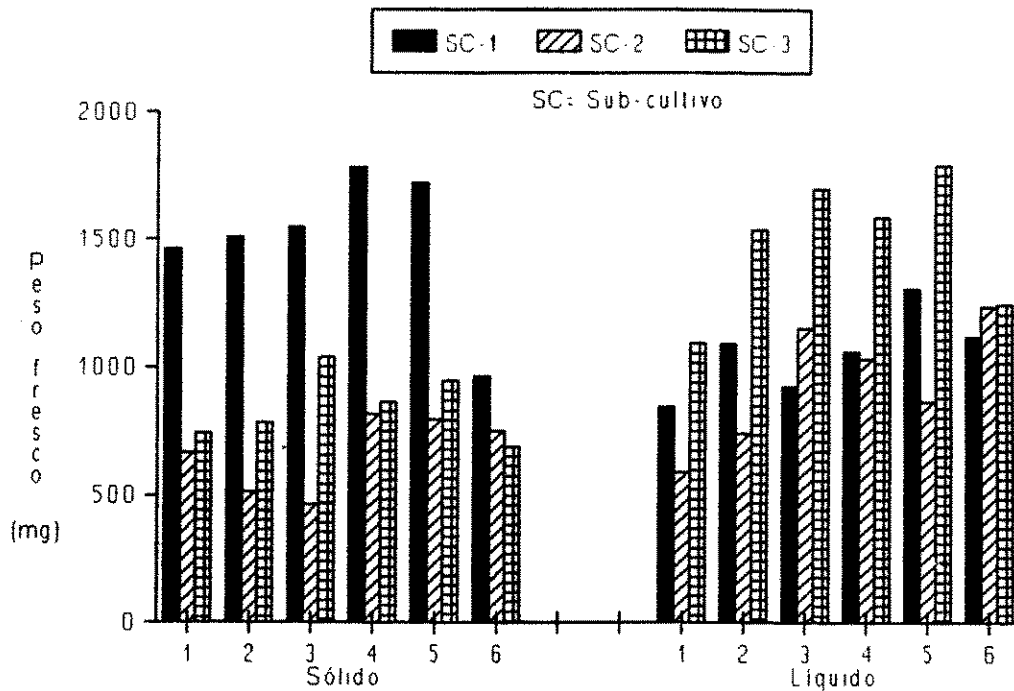


Figura 6. Peso promedio de hijos (mg) por explante y tratamiento obtenidos en el cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos.

mostraron diferencias significativas entre los tratamientos estudiados; sin embargo, se observan ligeros incrementos en los valores del peso de planta presentados en este sub-cultivo con respecto al anterior.

En los medios de cultivo de consistencia líquida se observó que las plantas alcanzaron mayores pesos que en los medios de consistencia semi-sólida.

En los tres sub-cultivos estudiados se observó que la adición de AIA influyó un ligero incremento en la ganancia de peso de los explantes en relación a aquellos tratamientos en los que no se empleó el AIA. Es probable que el AIA haya provocado relajación o ablandamiento de la pared celular en los tejidos de los explantes, lo que

asociado a un medio de consistencia líquida, pudo haber permitido una mayor absorción de agua y nutrientes, aumentando su peso; sin embargo esta afirmación no es concluyente puesto que se necesita realizar estudios más específicos que los desarrollados en esta oportunidad.

4.2.5 Número de raíces

El enraizamiento de los explantes fue favorecido por los medios de consistencia líquida en la mayoría de tratamientos estudiados.

En los sub-cultivos I y II, el tratamiento 4-L fue el que presentó el mayor número de raíces con 5.69 en el primer sub-cultivo y 3.13 raíces/planta en el segundo, no así en el sub-cultivo III, donde el mayor enraizamiento se produjo en los tratamientos 1-L, 2-L y 5-L con 5.56, 5.63 y 5.19 raíces/explante respectivamente (Figura 7).

En el tercer sub-cultivo los tratamientos 2-L, 1-L y 5-L estimularon el mayor enraizamiento con 5.63, 5.56 y 5.19 raíces/planta respectivamente, no habiendo diferencias significativas entre los mismos. El menor enraizamiento en este sub-cultivo se presentó en los tratamientos 6-L, 3-S y 6-S entre los que no hubo diferencias estadísticas significativas.

Según Bidwel (1990), el número de raíces en las plantas se ve influenciado por las relaciones hormonales en las plantas, mas específicamente por las concentraciones de auxinas. En el presente estudio además de la influencia de la consistencia líquida sobre el enraizamiento, se observó que las altas concentraciones de citocininas siempre bloquearon la diferenciación de raíces. El número de raíces no se incrementó significativamente con

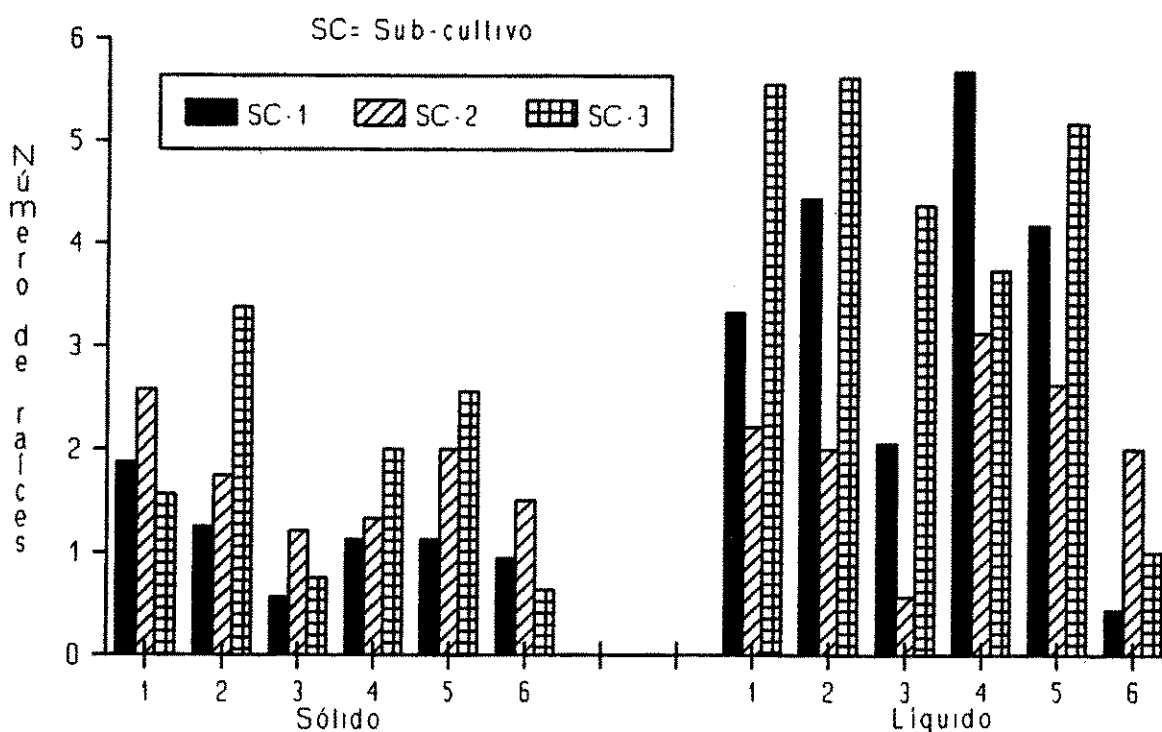


Figura 7. Número de raíces promedio por explante y tratamiento obtenidos en el cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos.

el empleo de auxina; probablemente se produjo un efecto antagónico entre éste regulador de crecimiento y la citocinina empleada que bloquea el desarrollo de éstas estructuras.

4.2.6 Longitud de raíces

La longitud de las raíces de los explantes fué influenciada por la consistencia del medio de cultivo en los tres sub-cultivos estudiados, presentando mayores longitudes de raíces los tratamientos establecidos en los medios de consistencia líquida, (figura 8).

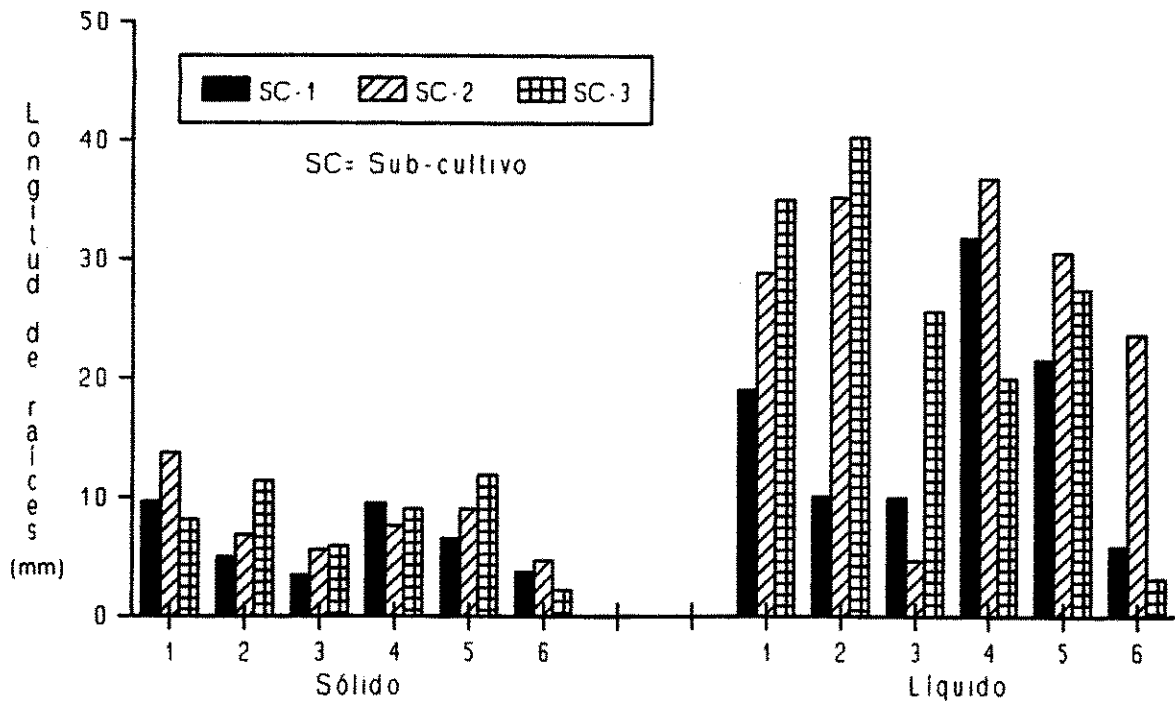


Figura 8. Longitud de raíces (mm) promedio por explante y tratamiento obtenidos en el cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos.

Tanto en el sub-cultivo I como en el II, el tratamiento 4-L mostró las mayores longitudes de raíces, no así en el tercer sub-cultivo donde las raíces de mayor longitud se presentaron en el tratamiento 2-L, por lo que se puede deducir que la longitud de raíces en este caso se vio influenciada tanto por la consistencia del medio de cultivo como por un aparente equilibrio en las concentraciones de reguladores de crecimiento, presentando raíces de mayor longitud los explantes a los que se les adicionó niveles de 5 y 7 mg/l de 6-BAP independientemente de la adición de AIA y los establecidos con 5 mg/l de 6-BAP pero con adición de AIA en el medio de cultivo líquido.

Aún cuando se ha demostrado que las auxinas estimulan el enraizamiento y aumentan la longitud de éstas (Bidwel, 1990), en este estudio no se evidenció este comportamiento, probablemente por un efecto antagónico de este regulador de crecimiento con la citocinina empleada en diferentes niveles. Es probable que si se hubiera introducido una variante en los tratamientos en la que solo se empleara auxina (sin la adición de citocinina), ésta hubiese permitido obtener una mejor conclusión en cuanto a la influencia de la auxina sobre el enraizamiento de los explantes en el cultivo *in vitro* de banano.

El efecto antagónico sobre la formación de raíces en los explantes fue más evidente cuando se adicionó la concentración más alta de citocinina (10 mg/l), observándose un incremento en el número de hijos y una disminución en el número de raíces.

V. DISCUSION GENERAL

El análisis comparativo de los resultados obtenidos en las diferentes variables y tratamientos en estudio, demuestra que la producción de plántulas *"in vitro"* fue influenciada tanto por la consistencia del medio de cultivo como por las concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento empleados. Los medios de consistencia semi-sólida indujeron una mayor proliferación de hijos y los medios de consistencia líquida favorecieron el comportamiento del resto de variables en estudio.

De lo anterior se deriva que tratamientos que favorecieron la producción de hijos, generalmente afectaron negativamente el desarrollo y crecimiento de raíces, altura, peso y frecuencia de las multiyemas y viceversa (Figuras 9, 10 y 11). Estos resultados permiten afirmar que en esta etapa se deben preferir los medios de consistencia semi-sólida sobre los líquidos para obtener altas tasas de proliferación con el mínimo riesgo de variabilidad.

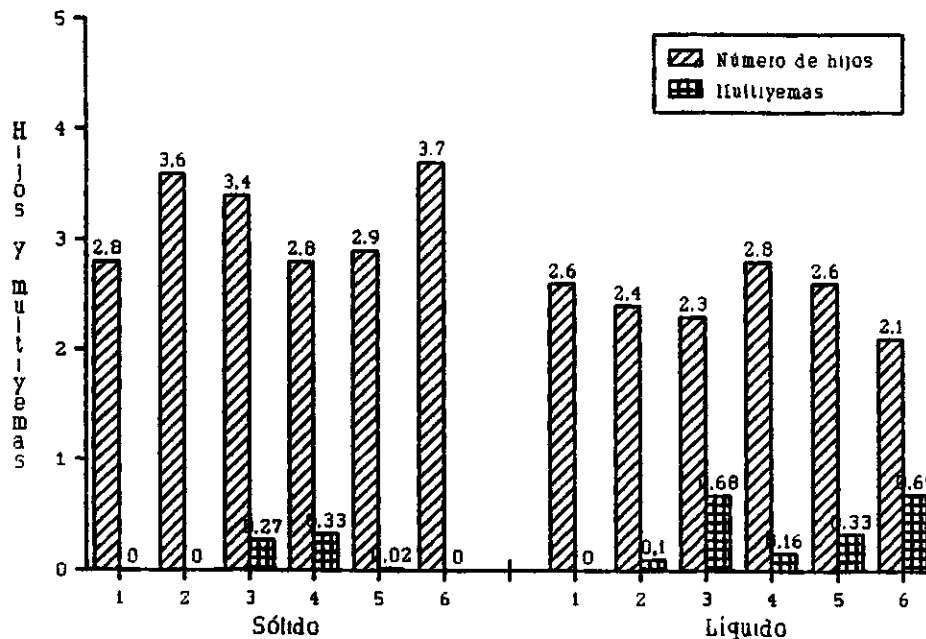


Figura 9. Valores promedio del número de hijos y multiyemas obtenidos en el cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos.

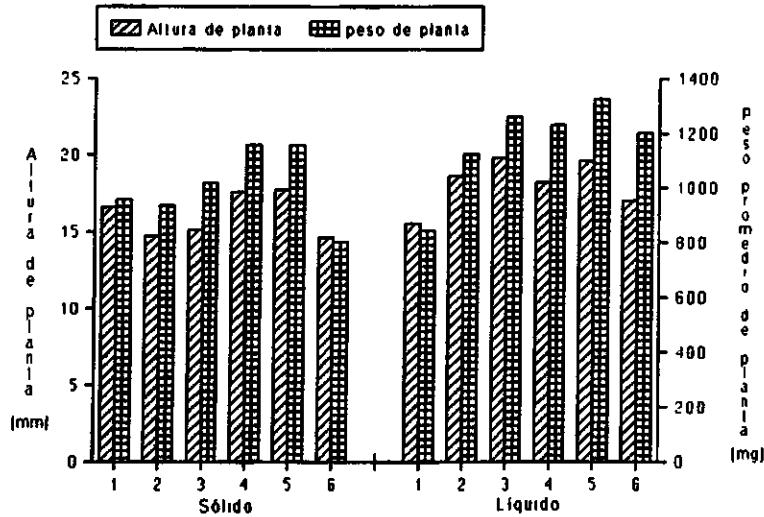


Figura 10. Altura y peso promedio obtenidos en el cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA), durante tres subcultivos.

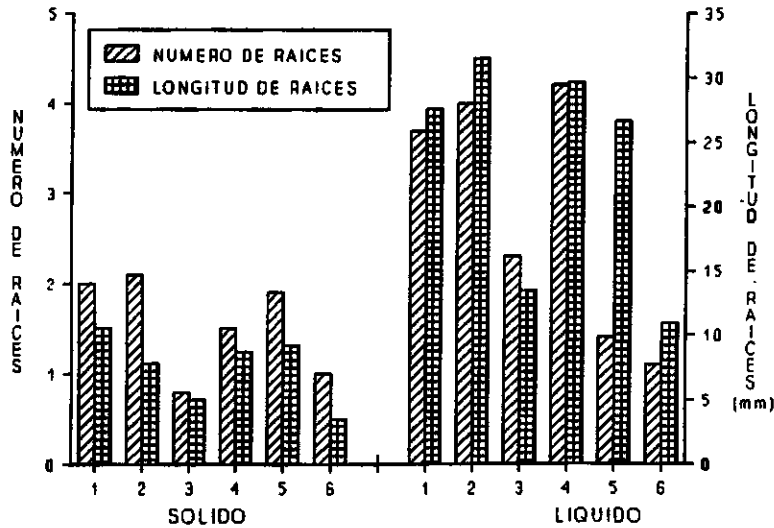


Figura 11. Número y longitud de raíces promedio obtenidas en el cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) durante tres sub-cultivos.

En la producción comercial *in vitro* de semilla el efecto que producen los reguladores de crecimiento y consistencia de los medios de cultivo sobre los explantes puede ser manipulado, de tal forma que es posible, según Pérez & Orellana (1989a), inducir el ahijamiento y/o acondicionamiento del explante para su establecimiento en viveros, en función del propósito que se requiera.

Una serie de investigadores y productores comerciales de semilla de musáceas (Sandoval, 1985; Maitelle & Foncelle, 1988; Smith, 1988; Pérez & Orellana, 1989a y 1989b) emplean medios de consistencia líquida en la etapa de establecimiento del explante, medios de consistencia semi-sólida durante la multiplicación o micropropagación y en la etapa de adaptación (acondicionamiento fisiológico de la planta para su posterior traslado a condiciones de campo) prefieren los medios de consistencia líquida.

Además, como parte de la estrategia en una producción comercial de bananos, debe considerarse el tiempo de estancia de las plantas en condiciones *in vitro*. En este sentido Pérez & Orellana (1989b), recomiendan reproducir los explantes por períodos no mayores a los 10 sub-cultivos o en su defecto obtener como máximo entre 1 000 y 16 000 hijos a partir de una misma yema inicial.

Si tomamos como base lo anteriormente planteado, y pretendiendo hacer una proyección de la producción potencial del clon de banano Enano Ecuatoriano, con los resultados obtenidos en los dos mejores tratamientos (6-S y 2-S), se podría llegar a producir potencialmente al final de diez sub-cultivos 480 858 y 365 615 hijos por explante inicial respectivamente. No obstante, este número de hijos refleja el potencial teórico de las plantas micropropagadas en dichos tratamientos y no debe

pretenderse llegar a éstos niveles de producción si se considera el riesgo de aparición de variabilidad somaclonal.

Cuando se requiere producir grandes cantidades de plántulas, en vez de obtener altos volúmenes de plantas a partir de un mismo explante inicial, lo correcto sería obtener ese mismo número final de plantas partiendo de un número mayor de explantes iniciales, pudiéndose incluso reducir el número de sub-cultivos y permanencia de las plantas *in vitro*.

De acuerdo a lo expresado por Rodríguez *et al.* (1987), en relación a la coexistencia de plantas con diferente capacidad organogenética en un mismo sub-cultivo, y en base a los resultados obtenidos en este estudio, sería recomendable emplear en la rutina de propagación comercial solo las plantas hijos y nietos como reproductoras, aunque al final del proceso (10^{mo} sub-cultivo,) la proliferación total sería disminuida. Sin embargo, como resultado de esta selección, las plantas que fueron madres en sub-cultivos anteriores podrían pasar a medios especiales para su enraizamiento y posterior acondicionamiento, permitiendo su retiro de los medios *in vitro* y finalmente el traslado a condiciones de campo.

La propagación clonal masiva del banano mediante la técnica de micropropagación, además de incrementar el número de hijos obtenidos por otros métodos, tiene otros atractivos como es la producción de material estéril, el corto período de tiempo que se necesita para su multiplicación y su potencial como fuente continua de material juvenil (Sandoval *et al.*, 1991).

La micropropagación ofrece un gran potencial para la conservación a largo plazo del germoplasma de banano en forma clonal mediante el manejo del material y del

ambiente, ofreciendo muchas ventajas, como son el que necesita poco espacio, se mantiene la calidad genética y por último, las posibilidades de contaminación son pocas; sin embargo es necesario realizar estudios posteriores que definan los requerimientos en cuanto a medios nutritivos, condiciones como temperatura, humedad, luz, etc. y períodos para el traslado del material a medios frescos.

VI. CONCLUSIONES

- 1.▶ En la etapa de establecimiento del explante los principales problemas que afectaron la adaptación a los medios de cultivo estéril fueron la contaminación por bacterias y hongos, la fenolización y muerte del explante por falta de adaptación.
- 2.▶ No se encontró relación entre el número de hijos y el número de sub-cultivos estudiados. El número de hijos por explante varió en dependencia de la capacidad organogénica del material establecido.
- 3.▶ La consistencia del medio de cultivo es un factor de mucha importancia en la producción de plantas *in vitro*, los medios de consistencia semi-sólida indujeron un mayor ahijamiento.
- 4.▶ Las combinaciones de reguladores de crecimiento de 1 mg/l AIA + 10 mg/l 6-BAP y 0 mg/l AIA + 7 mg/l 6-BAP en un medio de cultivo semi-sólido, fueron los que presentaron las mayores tasas de proliferación de brotes o hijos al final de los tres sub-cultivos con tasas de proliferación de 3.7 y 3.6 hijos/explante respectivamente.
- 5.▶ Altas concentraciones de 6-BAP (10 mg/l) y medios de cultivo de consistencia líquida mostraron influencia sobre la inducción de multiyemas. Los niveles de 5 y 7 mg/l de 6-BAP solo estimularon la formación de multiyemas cuando actuaron en conjunto con el AIA.
- 6.▶ Los medios de cultivo de consistencia líquida favorecieron la formación y alargamiento de raíces, así como aumentaron la altura y peso de los explantes.

- 7.▶ El número de hijos total obtenidos al final de los tres sub-cultivos en todos los tratamientos estudiados supera ampliamente la tasa que de ordinario se obtiene por el método de propagación tradicional y acelerado del banano Enano Ecuatoriano.**

VII. RECOMENDACIONES

- 1.▶ Emplear la técnica de micropropagación *in vitro* para la reproducción masiva de material vegetativo (semilla) del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA) en Nicaragua, considerando los resultados obtenidos en el presente estudio.
- 2.▶ Para la micropropagación *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA), se recomienda el empleo de concentraciones de 6-BAP de 7 mg/l o menores, y el uso de medios de consistencia semi-sólidos, sin la adición de AIA cuando el propósito sea la multiplicación de los explantes.
- 3.▶ Los medios de cultivo de consistencia líquida deberán emplearse tanto en la etapa de establecimiento de los explantes así como durante el acondicionamiento de los mismos para su traslado a condiciones ambientales normales.
- 4.▶ Para trabajos de propagación comercial no se recomienda el uso de medios de cultivo que generen altas tasas de proliferación, ni mantener los explantes en cultivo durante largos períodos.
- 5.▶ Estudiar el comportamiento en el campo de las plantas obtenidas *in vitro*.
- 6.▶ Sería de mucho interés el micropropagar y evaluar en condiciones de campo las plantas obtenidas a partir de multiyemas para estudiar su comportamiento y definir su utilidad en estudios de mejoramiento genético.
- 7.▶ Continuar el estudio de la micropropagación con diferentes clones de plátano y banano a fin de perfeccionar la técnica en la producción masiva de los principales clones de *Musa sp* cultivados en Nicaragua.

- 8.► Presentar a los productores bananeros los resultados de esta y otras investigaciones relacionadas con la micropropagación de clones de banano con el objetivo de coadyuvar a la modernización de la agricultura en Nicaragua.**

VIII. REFERENCIAS

- Aguilar, M. & Reyes, G. 1987. Estudio de cultivo *in vitro* en el mejoramiento y producción de semilla en plátano (*Musa sp.*). Universidad Central de las Villas, Facultad de Ciencias Agrícolas. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Tesis de Grado. 40 pp.
- Banerjee, N. & De Langhe, E. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (Banana and Plantains). Minnesota, U.S.A. En *Plant Cell Reports*. 12 pp.
- Berg, L. N. & Bustamante, M. 1974. Heat treatment and meristems culture for the production of virus free bananas. *Phytopathology*. 64 pp. 320-322.
- Bidwel, R. G. 1990. Fisiología Vegetal. Editorial A.G.T. Editor, S. A. México, D.F. Pp. 559-608 y 612-618.
- Caplin, S. M. 1963. Effect of initial size on growth of plant tissue cultures. *American Journal of Botany*. 50 pp. 41-94.
- CIAT, 1980. El cultivo de meristemas de yuca. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 40 pp.
- CONAGRO/BID/PNUD. 1995. Programa Nacional de Desarrollo del Sector Agropecuario. Programa de inversión pública trianual 1995/1997. Dirección general de inversión pública. Ministerio de Economía y Desarrollo. Managua, Nicaragua. 74 pp.

- Cote, F.; Alvarado, D.; Domínguez, R.; Navarro-Mastache, L. & Teisson, C. 1990. *Micropropagation in vitro* du bananier. Costa de Marfil. 7 pp.
- Cronauer, S. & Krikorian, A.D. 1984. Rapid multiplication of bananas and plantains by *in vitro* shoot tip culture. En *Hort Science* 19, 234-235.
- Damasco, O. & Barba, R. 1984. *In vitro* culture of "Saba" banana (*Musa sp.*) cv. "Saba" (BBB). *The Philippine agriculturist*. Philippines. 67:351-358.
- Filippia, R. 1987. Propagación intensiva de plátano, Manejo y consideraciones. Encuentro Técnico Nacional. Empresa Productora de Semilla. Ministerio de Agricultura. Instituto Nacional de Investigaciones y viandas tropicales. La Habana, Cuba. 9 pp.
- Filippia, R. & Pino, A. (sf). Propagación intensiva del plátano. Manejo y consideraciones. La Habana, Cuba. 9 pp.
- Fitchet, M. & Winnaar, W. 1988. Effect of sterilizants and nutrient media on the establishment of shoot tips of two banana cultivars in culture. *SUBTROPICA* 9(3). 5 pp.
- Gupta, P. M. 1986. Erradication for mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. En *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 12 pp.
- INIBAP. 1992. Bananas, plantains and INIBAP. International Network for the Improvement of Banana and Plantain. Annual report 1992. INIBAP. Montpellier, France. 64 pp.

- Jaramillo, R. 1987. La red internacional para el mejoramiento de banano y plátano (INIBAP). *ASBANA-Revista de la Asociación Bananera Nacional*. Costa Rica. 2(27): 2pp.
- Jarret, R. 1985. Bananas and plantains. A report presented to the IBPGR. IICA. Colombia. 41 pp.
- Lahav, E. & Turner, P. 1992, Nutrición del banano. Boletín N°7, segunda edición revisada. Publicado y traducido por el Instituto de la Potasa y el Fósforo (INPOFOS). Quito, Ecuador. 71 pp.
- MAG, 1990. Lineamientos para la reactivación del sector agropecuario. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Managua, Nicaragua. 27 pp.
- Mateille, T. & Foncelle, B. 1988. Micropropagation of Musa AAA cv. Poyo in the Ivory Coast. *Tropical Agriculture*. Vol. 65 No.4. 325-328 pp.
- MIDINRA-IICA. 1983. El plátano. Miscelánea IICA. Managua, Nicaragua. 37 pp.
- Molina, M.E. 1988. Micropropagación del banano. Dirección de Investigación. *ASBANA*. Revista de la Asociación Bananera Nacional. San José, Costa Rica. 2(28). 12 pp.
- Muller, L & Sandoval, J. 1986. In vitro germplasm conservation of Musa spp. In: *Abstracts, VI. International Congress Plant Tissue and Cell Culture*, Minnesota, United States of América. 426 pp.

- Murashige, T. & Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. *Physiology plantarum*. United States of América. 473-497 pp.
- Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Plant Physiology*. United States of América. 135-166 pp.
- Pedroza, H. 1993. Fundamentos de experimentación agrícola. Centro de Estudios de Ecodesarrollo para el Trópico (CECOTROPIC). Editorial de Arte. Managua, Nicaragua. 264 pp.
- Pérez, J. & Orellana, 1989a. Instructivo técnico para la micropropagación *in vitro* del plátano. Grupo de Biotecnología Universidad Central de las Villas, Cuba. 13 pp.
- Pérez, J. & Orellana, 1989b. Documento presentado ante el MINAGRI de Cuba para fundamentar la utilización de la técnica de Cultivo de tejidos. UCLV. Habana, Cuba. 33 pp.
- Pérez, L. & Soto, M. 1989. Análisis comparativo de algunas características vegetativas y de producción entre dos clones de banano (*Musa sp.*) Valery y Gran Enano. ASBANA. San José, Costa Rica. 2(13): 7-11 pp.
- Roca, M.; Escobar, R. & Mafla, G. 1992. Conservación de germoplasma de yuca *in vitro*. Principios y Técnicas. CIAT. Cali, Colombia. 15 Pp.
- Rodríguez, M.; Lorenzo, J. & García, A. 1987. Significance of the physiological history of the explant in the vegetative of banana shoot tips. *Acta Horticulturae* 212. Pp. 61-68.

- Sandoval, J. 1985. Micropropagación de Musáceas. Revista de la Asociación Bananera Nacional. ASBANA. San José, Costa Rica. 9(24):21-23.
- Sandoval, J. & Muller, L. 1987. Influencia del tamaño de explante en la propagación *in vitro* de cuatro cultivares de Musa. Dpto. de Producción Vegetal. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 11 pp.
- Sandoval, J. Brenes, G. & Pérez, L. 1991. Micropropagación de plátano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE. (*Serie Técnica, Informe técnico/CATIE N°186*). Turrialba, Costa Rica. 29 pp.
- Simmonds, N. W. 1973. Los plátanos. Editorial BLUME. Barcelona, España. 39 pp.
- Simmonds, N.W. & Sherpherd, K. 1955. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. Minnesota, USA. 55 pp.
- Smith, M. K. 1988. A review of factores influencing the genetic stability of micropropagated bananas. *Fruits*. vol 43. No.4 Pp. 219-223.
- Smith, M.K. & Hamill, S.D. 1990. *In vitro* mutation breeding for the development of bananas with resistance to race 4, Fusarium Wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense). *In vitro* mutation breeding of bananas and plantains I. Viena, Austria. Pp. 68-72.
- Soto, M. 1985. Bananos, Cultivo y comercialización. Litografía e Imprenta LIL, S.A. San José, Costa Rica. 627 pp.
- Surga, R. y Guevara Y. (sf). Problemas presentados por la polución bacteriana de tipo endógeno en el cultivo *in vitro* de ápices caulinares de musáceas. Centro

Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Departamento de Frutales.
Maracay, Venezuela. 9 pp.

Torcía, P. & Munguía, R. 1993. Fruticultura. Texto Básico. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Escuela de Producción Vegetal. Managua, Nicaragua. 299 pp.

UPEB. 1979. Avances en la propagación vegetativa del Banano. Boletín informativo de la Unión de Países Exportadores de Banano. Imprenta BANANAS. Panamá, República de Panamá. 3(24): 28-30.

Vasil, L. K. & Vasil, V. 1980. Clonal Propagation in International review of cytology. Supplement 11 A. Ed. AP. USA. 235 pp.

Vásquez, B. E. & Torres, G. S. 1981. Fisiología Vegetal. Editorial Pueblo y Educación. La Habana, Cuba. 463: 317-378.

Villalobos, A. 1985. Las bases morfogenéticas en la micropropagación de especies perennes. Editado por Manuel L. Robert y Víctor Manuel Loyola en el : Cultivo de Tejidos vegetales de México. 1ra. Edición. México, D.F. Pp. 55-62.

Vuylsteke, D. R. 1989. Shoop tip culture for the propagation, conservation and exchange of *Musa* germplasm. Practical Manual for Handling crop germoplasm *in vitro*. International Board for Plant Genetic Resources. Rome. 56 pp.

Vuylsteke, D. & De Langhe, E. 1984. Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. *Tropical Agriculture*. Trinidad. Vol. 62. No.4. Pp. 323-328.

Wilson, E. (1985). Rapid multiplication of plantain: An improved field technique. 3rd. Conference on plantain and other cooking bananas. Ivory Coast. 3 p.

Wong, W.C. 1986. *In vitro* propagation of banana (*Musa sp.*): Initiation, proliferation and development of shoot-tip cultures on defined media. *Plan cell tissue organ culture*. No.6, 159-166 pp.

ANEXO I

Tabla 4. Valores promedios obtenidos para las variables en estudio durante el primer sub-cultivo *in vitro* del clon de Banano Enano Ecuatoriano (AAA).

Trata- miento	Sub-cultivo I					
	Número de hijos	Altura (mm)	Peso (mg)	Número de raíces	Longitud de raíces (mm)	Presencia multiyemas
1-S	2.69 abc	13.56 b	1 459.38 a	1.88 d	9.69 cd	No se presentó multiyemas
2-S	4.25 ab	17.92 b	1 507.13 a	1.25 e	5.00 d	
3-S	4.13 ab	12.31 b	1 547.50 a	0.56 f	3.44 d	
4-S	3.63 ab	16.83 ab	1 786.25 a	1.13 e	9.50 cd	
5-S	3.81 ab	13.82 b	1 722.50 a	1.13 e	6.56 d	
6-S	4.50 a	13.17 b	963.44 b	0.94 e	3.75 d	
1-L						
2-L	2.81 abc	17.68 ab	845.63 b	3.33 c	19.06 ab	
3-L	2.49 abc	17.91 ab	1 090.63 b	4.44 b	10.09 abc	
4-L	2.50 abc	18.14 ab	924.13 b	2.06 d	10.00 cd	
5-L	3.00 abc	17.78 ab	1 060.63 b	5.69 a	31.88 a	
6-L	2.13 bc	21.31 a	1 308.75 ab	4.19 b	21.56 ab	
	1.55 c	14.92 ab	1 120.00 b	0.44 g	5.91 d	

Promedios con la misma letra no representan diferencias significativas según la Prueba de S.N.K. al 5 %.

ANEXO II

Tabla 5. Valores promedios obtenidos para las variables en estudio durante el segundo sub-cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA).

Trata- miento	Sub-cultivo II					
	Número de hijos	Altura (mm)	Peso (mg)	Número de raíces	Longitud raíces (mm)	Presencia multiyema
1-S	2.90 c	15.46 a	668.25 cd	2.58 b	13.75 bc	
2-S	3.68 a	16.00 a	514.38 d	1.75 cde	6.88 c	
3-S	2.38 d	14.10 a	463.75 d	1.21 e	5.63 c	3-S= 0.75
4-S	2.25 de	18.60 a	817.31 abcd	1.33 de	7.67 c	4-S= 0.69
5-S	2.25 de	19.82 a	796.25 bcd	2.00 bcd	9.06 c	
6-S	3.19 b	16.04 a	752.50 bcd	1.50 de	4.69 c	
1-L	2.38 d	15.12 a	591.28 cd	2.22 bc	28.88 ab	
2-L	1.41 f	19.64 a	741.81 bcd	2.00 bcd	35.20 a	2-L= 0.25
3-L	1.98 de	19.24 a	1 152.25 ab	0.56 f	4.69 c	3-L= 1.00
4-L	1.94 e	20.99 a	1 035.19 abc	3.13 a	36.88 a	4-L= 0.31
5-L	2.00 de	20.63 a	868.75 abcd	2.63 b	30.63 ab	5-L= 0.25
6-L	2.25 de	20.57 a	1 240.00 a	2.00 bcd	23.75 abc	6-L= 2.06

Promedios con la misma letra no representan diferencias significativas estadísticamente, según la Prueba de S.N.K. al 5 %.

ANEXO III

Tabla 6. Valores promedios obtenidos para las variables en estudio durante el tercer sub-cultivo *in vitro* del clon de banano Enano Ecuatoriano (AAA).

Trata- miento	Sub-cultivo III					
	Número de hijos	Altura (mm)	Peso (mg)	Número de raíces	Longitud de raíces (mm)	Presencia multiyema
1-S	2.75 cde	20.83 ab	744.00 a	1.56 e	8.13 de	
2-S	2.88 cde	10.08 b	782.50 a	3.38 c	11.41 de	
3-S	3.73 de	18.99 ab	1039.06 a	0.75 f	5.94 e	3-S= 0.06
4-S	2.38 e	17.40 ab	865.25 a	2.00 e	9.06 de	4-S= 0.31
5-S	2.75 cde	19.47 ab	946.25 a	2.56 d	11.88 de	5-S= 0.06
6-S	3.40 b	14.72 ab	690.00 a	0.63 f	2.19 e	
1-L	2.69 de	13.67 ab	1093.13 a	5.56 a	35.00 a	
2-L	3.19 bcd	18.35 ab	1536.25 a	5.63 a	40.31 a	2-L= 0.06
3-L	2.44 e	22.06 a	1700.63 a	4.38 b	25.63 bc	3-L= 1.06
4-L	3.33 bc	15.72 ab	1588.13 a	3.75 c	20.00 cd	4-L= 0.19
5-L	3.81 a	16.86 ab	1795.63 a	5.19 a	27.50 bc 3.13	5-L= 0.75
6-L	2.57 e	15.46 ab	1247.06 a	1.00 f		

Promedios con la misma letra no representan diferencias significativas estadísticamente, según la Prueba de S.N.K. al 5 %.