



Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Evaluación del Biorreactor con Movimiento Ondulatorio Temporal (BIMOT) en la micropropagación de plátano cv. Enano (*Musa spp.*)

Autores

Br. Cruz Alejandro Hernández Herrera
Br. Giovanny Elihú Calderón Lizano

Asesores

MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga
MSc. Roxana Yadira Cruz Cardona

Presentado a la consideración del honorable
comité evaluador como requisito final para
optar al grado de Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua
Septiembre, 2023

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable comité evaluador designado por el decanato de la Facultad de Agronomía como requisito final para optar al título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

Miembros del Comité Evaluador

MSc. Rodolfo Munguía Hernández
Presidente

Ing. Harlem Tania Ríos Peralta
Secretaria

MSc. Hellen Ruth Ramírez Velásquez
Vocal

Lugar y fecha: Managua, Nicaragua, 7 de septiembre de 2023

DEDICATORIA

Al **Creador**, porque en su infinito amor me da la vida, la salud y el entendimiento que me son indispensables para poder alcanzar cada meta.

A mis padres: **Blanca Rosa Herrera Gutiérrez y Cruz de los Santos Hernández González**, por darme su amor incondicional, por demostrarme en cada momento la inquebrantable seguridad de creer en mis sueños y por anhelar tanto verme convertido en profesional. Gracias a los valores que Ustedes me inculcaron, hoy soy un hombre de bien; enamorado de la vida, apasionado por el campo, pero, sobre todo, respetuoso de toda creación de Dios.

A mis queridísimos abuelos paternos y maternos que siempre han manifestado gran entrega por el bienestar de la familia y disposición de servicio al prójimo. Con su muestra de fe, lucha irrefutable y humildad siempre han sido un mayúsculo ejemplo para toda la familia a la cual me enorgullece pertenecer.

A mis hermanos **Elder Bladimir Hernández Herrera y Jorge Rosa Hernández Herrera**, porque ese amor y respeto hacia a mí, siempre me han comprometido a ser mejor. Gracias por verme como ejemplo. Ustedes también son mi gran bendición.

Br. Cruz Alejandro Hernández Herrera

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado:

A **Dios**, por obsequiarme la vida y por estar a mi lado en cada paso de mi crecimiento brindándome la estabilidad, sabiduría y libertad para avanzar ininterrumpidamente en mi carrera académica.

A mis padres **Jamileth Lizano Blandón** y **Hanameel Arodis Calderón González** quienes además de apoyarme incondicionalmente durante toda mi trayectoria, me han enseñado la importancia de ser productivo, humilde y tenaz en cumplir mis metas y sueños.

Al esfuerzo colectivo de investigadores y productores que laboran en el mejoramiento y producción de los cultivos y que durante años han aportado respuestas al sector agrícola para alimentar al mundo.

Br. Giovanni Elihú Calderón Lizano

AGRADECIMIENTO

A **Dios**, porque me ha bendecido con entendimiento, paciencia y optimismo, cuyas virtudes me han permitido ser constante para llegar a ser profesional.

¡Aleluya! ¡Alabado sea el Señor! Den gracias al Señor, porque Él es bueno; su gran amor perdura para siempre. (Salmo 106:1)

A la **Universidad Nacional Agraria (UNA)** “mi segunda casa” que me dio la oportunidad de formarme en la carrera que anhelé.

A mis asesores: **MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga** y **MSc. Roxana Yadira Cruz Cardona**, quienes además de brindarme todo el apoyo profesional y técnico, mostraron su afecto de respeto, amistad y compañerismo, cuyos vínculos fueron cruciales para un aprendizaje satisfactorio.

A **René Vado** y **Johnston Zeledón** por manifestar su apoyo en las primeras etapas de la investigación.

A la **Lic. Lucía Caldera Silva**, quien desde mis primeros años en esta alma mater me regaló sus sabios consejos y me instó a ser cada vez mejor.

Finalmente, expreso mi agradecimiento al **Br. Giovanni Elihú Calderón Lizano** y al **Ing. Agr. Alexander Josué Cajina Silva**, “hermanos de lucha” con quienes tuve el privilegio de coincidir y de compartir experiencias durante el maravilloso proceso de formación.

Br. Cruz Alejandro Hernández Herrera

AGRADECIMIENTO

A mis asesores, **MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga** y **MSc. Roxana Yadira Cruz Cardona**, por su compromiso y el privilegio que me dieron de trabajar de la mano con ellos en esta investigación, compartiendo sus conocimientos, su experiencia y su generosa amistad que fueron claves para cumplir nuestros objetivos.

Al personal del laboratorio **René Vado** y **Johnston Zeledón**, por su encarecida ayuda, voluntad, sugerencias y disposición durante las etapas de esta investigación.

A mi casa y familia **La UNA** que desde mis primeros pasos me brindó su apoyo y abrió las puertas para que mis aprendizajes fueran desarrollados con excelencia, gozando de numerosos recursos y de un equipo de maestros competentes y afables.

Finalmente, a mis principales amigos y colegas **Br. Cruz Alejandro**, **Br. Jaysson Fley**, **Lic. Ángel Martínez**, **Br. Yelsin Valenzuela** y **Br. Joel López**, por su amistad, su apoyo y su motivación para convertirme en un profesional destacado, tomando de ejemplo sus propios esfuerzos y logros de los que me hacen sentir muy orgulloso.

Br. Giovanni Elihú Calderón Lizano

ÍNDICE DE CONTENIDO

SESIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1. Estado de producción de plátano	4
3.2. Técnicas de propagación de semillas de plátano	4
3.2.1. Propagación <i>in vitro</i> de plantas	4
3.2.2. Micropropagación	5
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1. Ubicación del área de estudio	11
4.2. Esterilización de materiales y equipos	11
4.3. Selección del material y establecimiento	11
4.4. Fase de multiplicación de plátano cv. Enano en BIMOT	12
4.4.1. Experimento 1. Medios de cultivos y su efecto en el crecimiento de las plantas	12
4.4.2. Experimento 2. Tipos de tejidos y su efecto en el número de brotes	14

4.4.3.	Experimento 3. Efecto de la densidad de siembra en el crecimiento de las plantas	15
4.5.	Fase de enraizamiento	16
4.5.1.	Experimento 4. Efecto de la hormona AIA en la formación de raíces	16
4.6.	Fase de aclimatación	17
4.6.1.	Experimento 5. Respuesta de las vitroplantas al bioestimulante Protifert 56 LMW	17
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
5.1	Fase de multiplicación de plátano cv. Enano en BIMOT	19
5.1.1.	Experimento 1. Medios de cultivos y su efecto en el crecimiento de las plantas	19
5.1.2.	Experimento 2. Tipos de tejidos y su efecto en el número de brotes	21
5.1.3.	Experimento 3. Efecto de la densidad de siembra en el desarrollo de las plantas	23
5.2	Fase de enraizamiento	26
5.2.1.	Experimento 4. Efecto de la hormona AIA en la formación de raíces	26
5.3	Fase de aclimatación	29
5.3.1.	Experimento 5. Respuesta de las vitroplantas de plátano cv. Enano al bioestimulante Protifert 56 LMW	29
VI.	CONCLUSIONES	33
VII.	RECOMENDACIONES	34
VIII.	LITERATURA CITADA	35

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Variantes de medio de cultivo en la fase de multiplicación	13
2.	Variantes de medio de cultivo empleados en la fase de enraizamiento	16
3.	Resultados de las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y brotes en seis variantes de medios de cultivo en la fase de multiplicación de plátano cv. Enano evaluadas a las tres semanas	19
4.	Respuesta de las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y de brotes por efecto de la siembra de uno, dos y tres brotes axilares en la fase de multiplicación evaluadas a las tres semanas	21
5.	Respuesta de las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y de brotes por efecto de la densidad de siembra de 50, 60, 70 y 80 brotes axilares en la fase de multiplicación evaluadas a las tres semanas	24
6.	Respuesta de plantas pequeñas de plátano cv. Enano a las dosis de 0.00, 0.25 0.50 ml L ⁻¹ del bioestimulante Protifert LMW a las dos semanas de aclimatadas	29
7.	Respuesta de plantas medianas de plátano cv. Enano a las dosis de 0.00, 0.25 0.50 ml L ⁻¹ del bioestimulante Protifert LMW a las dos semanas de aclimatadas	30
8.	Respuesta de plantas grandes de plátano cv. Enano a las dosis de 0.00, 0.25 0.50 ml L ⁻¹ del bioestimulante Protifert LMW a las dos semanas de aclimatadas	31

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	a). Cormos de plátano cv. Enano. b). Rebrotos a los 30 días de la siembra en el cantero.	12
2.	Modelo de biorreactor BIMOT. UNA-2022.	13
3.	a) siembra con un brote, b) siembra de dos brotes, c) siembra de tres brotes.	15
4.	Clasificación de plantas por tamaños.	17
5.	Plantas de plátano cv. Enano mostrando hojas vigorosas a las tres semanas de evaluación en BIMOT.	22
6.	Efecto en la brotación axilar de las densidades de siembra de 50, 60, 70 y 80 brotes de plátano cv. Enano a las tres semanas de crecimiento en BIMOT.	25
7.	Efecto en la longitud del pseudotallo por la adición de distintas concentraciones de AIA, en plátano cv. Enano. Letras desiguales difieren para $p \leq 0.05$.	26
8.	Efecto en el número de hojas por la adición de distintas concentraciones de AIA, en plátano cv. Enano. Letras desiguales difieren para $p \leq 0.05$	27
9.	Efecto en el número de raíces por la adición de distintas concentraciones de AIA, en plátano cv. Enano. Letras desiguales difieren para $p \leq 0.05$.	27
10.	Efecto de las concentraciones de AIA: a) 0.00 mg L^{-1} b) 0.50 mg L^{-1} c) 1.00 mg L^{-1} en la fase de enraizamiento en BIMOT.	28
11.	Plantas grandes mayores de 5 cm, plantas medianas entre 3.1- 5 cm y plantas pequeñas entre 1-3 cm.	32

RESUMEN

La micropropagación tradicional favorece la obtención de plantas sanas y productivas gracias a la herencia de características genéticamente similares a una planta madre, sin embargo, la técnica integra una serie de limitaciones con el uso de medios gelificados. La necesidad de optimizar los procesos de multiplicación y reducir la manipulación de tejidos por estrés ambiental y enfermedades puede solucionarse utilizando sistemas de inmersión temporal. El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA), km 12.5 carretera panamericana norte Managua, Nicaragua. Se evaluó el efecto del 6-BAP y del AIA en plátano cv. Enano *Musa* spp. en la fase de multiplicación en Biorreactores de Movimiento Ondulatorio Temporal (BIMOT), además se estudiaron los efectos de tres tipos de tejidos y de las densidades de tejidos de 50, 60 70 y 80 por BIMOT en el número de brotes. Se estudió la respuesta de producción de raíces en las plantas formadas por el efecto de tres variantes de AIA: 0.00, 0.50 y 1.00 mg L⁻¹. En la fase de aclimatación se probó el efecto del bioestimulante Protifert LMW en tres variantes: 0.00, 0.25 y 0.50 ml L⁻¹. En las etapas de multiplicación, enraizamiento y aclimatación se realizaron análisis de varianza y para definir el comportamiento de las medias se realizó la prueba de rangos múltiples de medias de Duncan $\alpha = 0.05$. En la fase de multiplicación la combinación de 2.25 de mg L⁻¹ de BAP con 0.65 mg L⁻¹ de AIA y con solo 2.50 mg L⁻¹ de BAP resultaron significativamente superiores las variables evaluadas. La siembra del brote principal con uno o dos brotes axilares presentaron similar respuesta estadística en las variables evaluadas. Las densidades de tejidos de 60, 70 y 80 brotes favorecieron el incremento del número de brotes axilares. Con la adición de 1.00 mg L⁻¹ de AIA se obtuvo la mejor respuesta en número de raíces. En la fase de aclimatación las categorías de plantas pequeñas, medianas y grandes con dosis de 0.50 ml L⁻¹ del bioestimulante Protifert LMW presentaron mejor comportamiento estadístico en las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y número de raíces, mientras que la supervivencia fue del 100 % en los tres tratamientos por cada tamaño de planta.

Palabras claves: Brotes axilares, cv. Enano, Micropropagación, BIMOT, Protifert LMW

ABSTRACT

Traditional micropropagation favors obtaining healthy and productive plants thanks to the inheritance of genetically similar characteristics to a mother plant, however, the technique integrates a series of limitations with the use of gelled media. The need to optimize the multiplication processes and reduce the handling of tissues due to environmental stress and diseases can be solved using temporary immersion systems. The study was carried out in the tissue culture laboratory of the National Agrarian University (UNA), km 12.5 north Pan-American highway, Managua, Nicaragua. The effect of 6-BAP and AIA plantain cv. Enano (*Musa* spp.) in the multiplication phase in Temporary Wave Motion Bioreactors (BIMOT), in addition, the effects of three types of tissues and the tissue densities of 50, 60, 70 and 80 by BIMOT on the number of shoots. The root production response in plants formed by adding IAA doses of 0.00, 0.50 and 1.00 mg L⁻¹ was studied. In the acclimatization phase, the effect of the biostimulant Protifert LMW applied in doses of 0.00, 0.25 and 0.50 ml L⁻¹ was tested. In the multiplication, rooting and acclimatization phases, analysis of variance was performed and to define the behavior of the means, Duncan's multiple range test of means $\alpha = 0.05$ was performed. In the multiplication phase, the combination of 2.25 mg L⁻¹ of BAP with 0.65 mg L⁻¹ of AIA and with only 2.50 mg L⁻¹ of BAP were significantly superior to the evaluated variables. Planting the main shoot with one or two axillary shoots presented a similar statistical response in the evaluated variables. The tissue densities of 60, 70 and 80 shoots favored the increase in the number of axillary shoots. With the addition of 1.00 mg L⁻¹ of IAA, the best response in number of roots was obtained. In the acclimatization phase, the categories of small, medium and large plants with doses of 0.50 ml L⁻¹ of the biostimulant Protifert LMW presented better statistical behavior in the variables pseudostem length, number of leaves and number of roots, while survival was 100 % in the three treatments for each plant size.

Keywords: Axillary shoots, cv. Enano, Micropropagation, BIMOT, Protifert LMW

I. INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2006) afirma que el cultivo de plátano y banano ocupan el cuarto lugar de importancia en la tierra, por ser el sustento económico y alimenticio de millones de personas en más de 120 países, esencialmente de América Latina y el Caribe, en donde la producción se encuentra a cargo de pequeños y medianos productores con manejo mayormente de tipo tradicional

El plátano es una fruta tropical originada en el sudoeste asiático, perteneciente a la familia de las musáceas, es un híbrido triploide de *Musa acuminata* Colla (genoma A) y *Musa balbisiana* Colla (genoma B), el plátano se cultivaba en el sur de la India, de allí se distribuyó a Malasia, Madagascar, Japón y Samoa; finalmente llegó al Caribe y Latinoamérica, poco después del descubrimiento del continente (FAO, 2000).

En Nicaragua, el plátano es uno de los complementos básicos de la dieta familiar, su cultivo y producción son actividades generadoras de empleos e ingresos. En el 2022 la producción fue de 1,032 millones de kilos, aportando a la economía nicaragüense 18.2 millones de dólares que representa un crecimiento del 21.8 % respecto al año anterior (Ministerio Agropecuario [MAG], 2023).

Los procesos biotecnológicos como las técnicas de cultivo *in vitro* permiten trasladar al campo plantas libres de contaminación por plagas o enfermedades, producto de la propagación de yemas jóvenes y sanas que se cultivan en condiciones óptimas para su crecimiento, estos procedimientos garantizan la protección del tejido vegetal ante ataques agresivos por microorganismos como hongos, bacterias y virus (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA], 2016).

Uno de los conceptos más extendidos en el cultivo *in vitro* es la propagación clonal o micropropagación, consiste en multiplicar un fragmento de tejido vegetal procedente de una planta madre, a este tipo de tejido se le denomina explante. Con esta técnica se obtienen plantas análogas también llamadas clones y poseen características genéticamente iguales conferidas por el tejido principal. (Quintanilla, 2015)

Hewstone y Reyes (1999) consideran que existe una variación de técnicas para desarrollar plantas *in vitro*, cada una de ellas es seleccionada en dependencia de los objetivos que el investigador persiga, las condiciones que presente el cultivo y el origen de los explantes (células, tejidos, meristemas, órganos, etc.).

Angarita y Perea (1984) plantean que la técnica de cultivos *in vitro* permite propagar musáceas en ambientes controlados a nivel de laboratorio, entre las ventajas que sobresalen con este sistema son: la producción a gran escala en cualquier época del año, así como la selección de clones con características sobresalientes, adaptables y resistentes al estrés ambiental y al ataque de organismos plagas.

Aguilar y Cruz (2014) afirman que la micropropagación tradicional es limitada en comparación al uso de biorreactores para propagar plantas, como principales desventajas se encuentran: un mayor esfuerzo de trabajo, altos costos de productos gelificantes como el agar, el uso de recipientes en mayores cantidades y la ocupación de extensas áreas de trabajo para el crecimiento y propagación de cultivos *in vitro*.

El modelo de Biorreactores de Movimiento Ondulatorio Temporal (BIMOT) empleado en el presente estudio es el resultado de un proceso de ajustes necesarios para lograr su innovación, este se desarrolló en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA) con el objetivo de lograr la micropropagación masiva de plátano cv. Enano (*Musa* spp.) disminuyendo significativamente el costo de los materiales y accesorios requeridos para su construcción. Además, se pretende obtener resultados favorables en la reducción del tiempo de producción de plantas garantizando su fitosanidad y calidad genética.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar el modelo de Biorreactor con Movimiento Ondulatorio Temporal (BIMOT) en la micropropagación de plátano cv. Enano (*Musa spp.*) en las fases de multiplicación, enraizamiento y la respuesta de las plantas obtenidas en la fase de aclimatación.

2.2. Objetivos específicos

- _ Definir la mejor variante de medio de cultivo y el tipo de tejido en la fase de multiplicación en el biorreactor BIMOT en base a la respuesta de las variables longitud de brote principal, número de brotes axilares y número de hojas por planta.
- _ Seleccionar la mejor densidad de siembra (50, 60, 70 y 80 brotes axilares) en el modelo de biorreactor BIMOT en base a la respuesta de las variables evaluadas.
- _ Determinar en la fase de enraizamiento la mejor variante de medio de cultivo en tejidos inoculados en biorreactores BIMOT.
- _ Analizar la respuesta de plantas *in vitro* de plátano cv. Enano en fase de aclimatación por la acción del bioestimulante Protifert 56 LMW.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1. Estado de producción de plátano

Los agricultores de plátanos utilizan prácticas tradicionales en la selección y multiplicación del material de siembra, este modelo conduce a la diseminación de enfermedades producto de la variabilidad de hijos con diferentes calidades. Asimismo, las plataneras convencionales favorecen la propagación de plagas como el picudo negro del plátano (*Cosmopolitus sordidus* Germ) y el nemátodo (*Rhadopholus similis*) debido al intercambio de semillas no seleccionada y con origen desconocido. (Aguilar *et al.*, 2004)

El Ministerio de Fomento, Industria y Comercio (MIFIC, 2022) sostiene que, en el 2021, la producción de musáceas en Nicaragua, específicamente plátano generó más de US\$ 54.1 millones, para el ciclo 2021/22 se logró producir 940 millones de unidades de plátano, de las que se exportaron 1.4 millones de unidades. En contraste en el 2022 se registró un incremento sostenido que ha generado empleos desde la cadena productiva hasta las áreas de exportación pues se evidencia una producción nacional de 9.8 % (1,032 millones de unidades) que superan lo generado en el ciclo anterior. (El 19 Digital, 2023)

3.2. Técnicas de propagación de semillas de plátano

El método comercialmente usado para la propagación de plátano es a través de una estructura especializada llamada cormo y se caracteriza por integrar numerosas yemas que al brotar forman diferentes tipos de hijos, siendo los de espada los más utilizados, la descendencia de estas plantas guarda los caracteres genéticos de la madre, sin embargo, el crecimiento de los hijos no es uniforme, lo que provoca una desigualdad de tamaño, tiempo de maduración y retrasos en la cosecha. (Godoy *et al.*, 2016)

3.2.1. Propagación *in vitro* de plantas

El cultivo *in vitro* es una técnica que se hace en condiciones estériles y se realiza tomando de la planta el ápice vegetativo, posteriormente se lleva a un frasco que contiene un medio nutritivo que le garantiza su desarrollo igual que si estuviera en campo. El medio de cultivo nutritivo debe tener los componentes básicos para obtener una repuesta adecuada. Estos son: macronutrientes, micronutrientes, fuente de carbono (azúcar), vitaminas y reguladores de crecimientos: auxinas y citocininas. (Servicio Nacional de Aprendizaje [SENA], Corporación Colombiana de

Investigación Agropecuaria [CORPOICA] y Proyectos Nacionales de Transferencias de Tecnologías Agropecuarias [PRONATTA], 1997)

Los reguladores de crecimiento que se utilizan en la propagación *in vitro* son hormonas vegetales o fitohormonas, estas ejercen su función en muy bajas concentraciones y el principal efecto se produce a nivel celular, cambiando los patrones de crecimiento de los vegetales y permitiendo su control. Las citoquininas (6-BAP) estimulan la generación de brotes axilares a nivel vegetal, y las auxinas (AIA) son responsables del aumento de la dominancia apical y la formación y elongación de tallos (Alcántara *et al.*, 2019).

Con las técnicas de propagación *in vitro* se asegura una rápida producción de plantas de plátano y banano, sin embargo, existen una serie de problemas que impiden el máximo rendimiento y vigor de las plantas, algunos de estos están relacionados con la hiperhidricidad, la necrosis, la variabilidad genética durante la práctica y la abscisión o separación de meristemas apicales y hojas. (Cejas *et al.*, 2011)

Kottackal *et al.* (2007) afirman que la capacidad genética y morfológica de las plantas y los índices de propagación de los tejidos son variables, dependen de factores relacionados a las características del explante como el tamaño del brote, el tipo de corte, la cantidad de brotes, la consistencia del medio de cultivo (gelificado o líquido) y del estado fisiológico del tejido.

3.2.2. Micropropagación

La micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas, de tejidos o células cultivadas asépticamente en un tubo de ensayo o en otro recipiente en que se puedan controlar estrictamente las condiciones de ambiente y nutrición (Hartmann y Kester, 1997).

La micropropagación le permite al productor adquirir material de siembra libre de plagas y enfermedades, una alta disponibilidad en cualquier época del año, garantizar la cantidad y edad acorde a las necesidades del agricultor permitiendo transportar cómodamente los propágulos, que aseguran una población de plántulas uniformes con características deseables en cuanto a rendimiento y calidad del fruto, además, las cosechas tendrán intervenciones más cortas (Sandoval, 2001).

Sobre el proceso de propagación clonal Perea *et al.* (2009) afirman que en dependencia del sistema de cultivo y su mantenimiento, estos están caracterizados por la producción de plantas genéticamente iguales a partir de un segmento vegetativo de una planta progenitora, sin embargo, la respuesta organogénica no siempre es la misma ya que está influenciada por la fisiología y tipo de explante, los elementos que componen el medio de cultivo y las características propias de la especie.

Sharry *et al.* (2015) definen explantes o explantos a tejidos vegetales capaz de regenerarse, entre ellos mencionan algunos ejemplos: ápices de raíces o de tallos, primordios de hojas, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo o de hojas, ovarios, óvulos, anteras y polen, todos ellos se cultivan en ambientes altamente asépticos en un medio con nutrientes.

En musáceas se utilizan las técnicas de tejidos vegetales con el uso de yemas apicales provenientes de hijuelos, Castro *et al.* (2002) sostienen que estos métodos constituyen una de las prácticas más importantes de la biotecnología para la obtención de grandes volúmenes de plantas de plátanos y bananos libres de plagas y enfermedades causadas por hongos y bacterias.

Sobre la propagación *in vitro* en plantas del género *Musa*, Cejas *et al.* (2011) plantean lo siguiente:

A escala comercial se ha consolidado mundialmente y la regeneración vía organogénesis a partir de ápices se mantiene como el método más utilizado. Esto se debe, principalmente, a la posibilidad de multiplicar plantas libres de patógenos con una adecuada estabilidad genética. Las técnicas comerciales de micropropagación de bananos y plátanos forman parte de la modernización de la agricultura y contribuyen a mejorar las condiciones sanitarias y productivas de las plantaciones (p. 14).

La micropropagación de cualquier especie incluye: la fase de multiplicación, es la de mayor costo debido al uso de agentes gelificantes y mano de obra capacitada (Pérez *et al.*, 1998; Adelberg *et al.*, 2007); una fase de enraizamiento, en ella cada brote, esqueje o yema debe crecer y desarrollar un tallo o pseudotallo y las primeras raíces (Orellana, 1998a), y una fase de aclimatación, en esta es donde se registran más pérdidas de plantas a causa del cambio brusco de condiciones controladas a un ambiente natural que muchas veces estresa las vitroplantas (van Huylenbroeck *et al.*, 1998).

Castillo (2004) agrega que los explantes enraizados que crecieron en ambientes controlados no poseen estomas funcionales (estructuras que les permitan regular los procesos de transpiración), por lo tanto, al momento de ser trasladados al área de aclimatación hay una influencia mayor de desecación de las plantas, por otra parte, la adaptación en condiciones *in vitro* con alta humedad relativa involucra que los explantes no desarrollen una cutícula con cera bien desarrollada que les impida perder agua en toda la superficie vegetal.

a) Micropropagación convencional

El uso de la micropropagación de plantas a nivel comercial se ve limitada por factores como la necesidad de mano de obra especializada, además como señalan Posada-Pérez *et al.* (2003) en los métodos de micropropagación de plantas se usan medios semisólidos de manera habitual, también el empleo y manejo de gran número de recipientes y esto aumenta los costos de operación.

Albarrán *et al.* (2014) identifican que hasta la fecha los métodos tradicionales no cumplen con la producción masiva que demandan los agricultores, pues, solo aquellas especies con un alto retorno económico son rentables a gran escala, esto es producto de los elevados costos en materiales para el establecimiento y subcultivos de los explantes que implica mayor número de recipientes, amplios espacios para el crecimiento y desarrollo de los propágulos, procesamiento de medios gelificados y una carga de personal especializado en la manipulación de los tejidos y la preparación de medios.

Denchev *et al.* (1992) confirman que, aunque en la micropropagación convencional la manipulación es la principal parte del trabajo, también es la más engorrosa debido a los diferentes procedimientos que se presentan en cada etapa, además, debe añadirse los reducidos índices de multiplicación que acarrear la preparación de nuevos subcultivos y por consiguiente más uso de mano de obra. Todas estas limitantes contribuyen a incrementar sustancialmente los costos de producción y de comercialización de las plantas *in vitro*.

La micropropagación convencional genera altos costos de producción debido al crecimiento y proliferación de los cultivos *in vitro* que agotan los recursos nutritivos de los medios gelificados, se requiere de transferencias rutinarias a medios nuevos que generalmente se realizan cada cuatro o seis semanas (Deberh & Maene, 1985, como se citó en Etienne & Berthouly, 2002).

b) Micropropagación en Biorreactores de Inmersión Temporal

Los biorreactores son aparatos diseñados para el cultivo a gran escala de células, tejidos u órganos en medio líquido. Para un creciente número de especies, éstos han mostrado ventajas sobre la micropropagación en medio semisólido, resultando en mayores tasas de multiplicación, reducción de espacio, energía y mano de obra (FAO y Organismo Internacional de Energía Atómica [IAEA], 2004).

En los últimos años se han desarrollado investigaciones sobre la automatización en la propagación de plantas, que incluyen el diseño de nuevos sistemas para la micropropagación, ya que reducen el costo por explante, permiten una mayor optimización biológica por los altos coeficientes de multiplicación que se obtienen y un mejor comportamiento de las vitroplantas *ex vitro* por mayor metabolismo autótrofico durante la fase *in vitro* (Aitken-Christie *et al.*, 1995).

En Galán *et al.* (2018) se describen los biorreactores como complejos recipientes de cultivo que posibilitan el control preciso de los indicadores físicos y químicos del medio. La definición “biorreactor” se encuentra muy extendida en el ámbito de la micropropagación donde se refiere al empleo de medios líquidos en recipientes de cultivo semiautomatizados para intensificar la producción de propágulos.

Para Posada (2003), utilizar un medio líquido para regenerar plantas es ideal sobre todo en el uso comercial a gran escala ya que reduce la continua manipulación manual que genera costes de tiempo, espacio y personal, y disminuye la interacción con el material al simplificar los cambios de medios.

Entre las variables a controlar en los biorreactores están la duración y la frecuencia de la inmersión, el volumen del medio y del recipiente, así como el periodo de cambio del medio de cultivo. Cuando se trabaja con cultivos *in vitro* se deben hacer subcultivos mensuales o cada dos meses en dependencia del tipo de la especie en estudio. Estos subcultivos se deben hacer para iniciar la propagación de crecimiento de las plantas (Albarrán *et al.*, 2014).

Dentro de las mejoras alcanzadas en los Sistemas de Inmersión Temporal (SIT), sobresalen la producción de mejores brotes con relación a talla, peso y sistema de raíz. Asimismo, se aumenta la acción fotosintética y reduce la respiración celular, con lo que se manifiesta una mayor

acumulación de almidón en las hojas. Esto, asociado a una óptima regulación estomática, proporciona a las plantas producidas en SIT mejor capacidad de supervivencia en la etapa de aclimatación. (Galán *et al.*, 2018)

De acuerdo con Cejas *et al.* (2011) la producción de plantas con el uso de biorreactores constituye un mecanismo eficaz para la multiplicación *in vitro* con la que se aumentan los coeficientes de propagación y se incrementa la calidad del material multiplicado. Entre los factores que inciden en este proceso son las cualidades de los explantes que se usan para inocular los biorreactores, manejo de estos y su estado fisiológico. Estos factores unidos con los indicadores de eficiencia del sistema, son claves a tener en cuenta en el estudio de la morfogénesis del cultivo de plátano, que presenta tasas de proliferación bajas en medio semisólido.

Como afirman Galán *et al.* (2018) la aplicación de Sistemas de Inmersión Temporal (SIT) no constituye un sistema único de cultivo, completándose con el uso convencional de medios sólidos, semisólidos o líquidos en fases previas (establecimiento del material, multiplicación inicial de brotes) o posteriores (enraizamiento) del proceso de micropropagación.

Los SIT se han empleado para la multiplicación *in vitro* de diferentes cultivares de *Musa* spp. y permiten obtener elevados coeficientes de multiplicación. Sin embargo, no todos muestran una respuesta similar y por tanto se deben ajustar las principales variables que influyen en el coeficiente de multiplicación y la calidad de las plantas, de acuerdo a lo reportado por varios autores (Posada-Pérez *et al.*, 2003; De Fera *et al.*, 2005; Aragón *et al.*, 2006; Basail *et al.*, 2007 y Basail *et al.*, 2011, como se citó en Basail *et al.*, 2012).

La inmersión temporal en los biorreactores es una técnica eficiente para la propagación *in vitro*, en este proceso se maximiza el coeficiente de multiplicación y la calidad de las plantas, la actividad consiste en someter las plantas a una inmersión en medio de cultivo líquido provocando variaciones fisiológicas causantes de la calidad de las mismas (Aragón *et al.*, 2004).

El sistema de inmersión temporal en biorreactores constituye una herramienta tecnológica interesante, principalmente para el sector dedicado a la multiplicación masiva asexual de plantas, dado que permite mejorar tanto la eficiencia de los procesos de propagación *in vitro* en

distintas especies, como la reducción del costo por unidad de planta producida (Aguilar y Cruz, 2014).

“Con el modelo de Biorreactor de Movimiento Ondulatorio Temporal (BIMOT), la inmersión de los tejidos se realiza en un solo recipiente de plástico con inyección de aire comprimido que permite que el medio de cultivo líquido suba hasta la parte superior de la rejilla de malla plástica donde se colocan los tejidos. La entrada del flujo de aire permite que los tejidos se remojen durante el tiempo que se aplique la inmersión.” (Marbell, A., comunicación personal, 23 de junio de 2022)

c) Bioestimulantes en la fase de aclimatación

La aclimatación radica en transferir plantas completas producidas *in vitro* a un ambiente exterior, el proceso de cambio se debe hacer progresivamente y con cuidado. Para minimizar el estrés en esta etapa y maximizar la supervivencia, es fundamental manejar adecuadamente la humedad relativa del aire, las condiciones del sustrato, la temperatura y la luz (Oliveira *et al.*, 2013).

En la etapa de aclimatación, el uso de bioestimulantes contribuye a mejorar la respuesta del metabolismo de la planta ante factores externos que debiliten el crecimiento de la misma. Los bioestimulantes son productos que realizan una función diferente a la de los fertilizantes, de hecho, Du Jardín (2019) afirma que su función no es suministrar nutrientes ni proteger la planta contra plagas y patógenos, sino modular las funciones de la planta de manera que se beneficie su nutrición y su capacidad de tolerancia al estrés ambiental.

Algunos bioestimulantes como el Protifer LMW están compuestos por aminoácidos y mezclas de péptidos. De acuerdo a García (2017) “Los aminoácidos que componen los bioestimulantes comerciales (que normalmente son mezclas de varios aminoácidos) se obtienen a partir de la hidrólisis enzimática (por hidrolasas) o química de extractos biológicos, normalmente vegetales” (p. 1)

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del área de estudio

La micropropagación de plátano (*Musa* spp.) cv. Enano, se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía (FAGRO) en la Universidad Nacional Agraria, ubicado en el km 12 ½ carretera Norte, Managua. El estudio se efectuó durante el periodo comprendido entre mayo 2022 a junio de 2023.

4.2. Esterilización de materiales y equipos

En la limpieza de la cristalería se utilizó hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % dejándola sumergidas durante 24 horas, después se llevó a cabo un enjuague con agua potable y detergente, posteriormente se dejó escurriendo por dos horas. Previo a la siembra de los tejidos *in vitro*, los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante una hora. Las placas, pinzas y bisturís se esterilizaron en el horno a temperaturas de 180 °C durante una hora. La cámara de flujo laminar fue desinfectada con NaClO al 1 %, posteriormente se expuso a luz ultravioleta (utilizada para inactivar microorganismos del ambiente) durante 30 minutos.

4.3. Selección del material y establecimiento

El material vegetativo, se seleccionó de la plantación de plátano cv. Enano establecido en la finca experimental “El Plantel” propiedad de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km 43 ½ carretera Tipitapa – Masaya. Se seleccionaron cormos de plantas que presentaran buen estado fitosanitario, que formaran racimos con dedos de buen tamaño, con cantidad superior a las 30 unidades. Los cormos se establecieron en canteros y se implementó la Técnica de Reproducción Acelerada de Semillas (TRAS) reportada por Aguilar *et al.* (2004). A los 30 días se extrajeron yemas apicales para dar inicio con los experimentos en las fases de multiplicación, enraizamiento y aclimatación.

En las variantes de medios de cultivos utilizadas en los experimentos del uno al cuatro, se empleó como medio base las sales de Murashige y Skoog (1962).

La preparación, desinfección y siembra de los cormos en los canteros, así como el procedimiento requerido para el establecimiento en condiciones de asepsia de los ápices caulinares en tubos de ensayo se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Castro y Maradiaga (2015). En la Figura 1, se observan los cormos de plátano cv. Enano, preparados para su siembra en canteros y en el sector de la derecha se aprecian los rebrotes a los 30 días después del establecimiento.



Figura 1. a). Cormos de plátano cv. Enano. b). Rebotes a los 30 días de la siembra en el cantero.

4.4. Fase de multiplicación de plátano cv Enano en BIMOT

4.4.1. Experimento 1. Medios de cultivos y su efecto en el crecimiento de las plantas

En este experimento, la mejor variante de medio de cultivo se definió en base al promedio de número de brotes de los tejidos y a las características morfológicas (longitud del pseudotallo y número de hojas) que estos presentaron. Los reguladores de crecimiento que se utilizaron fueron la citoquinina 6- Bencilaminopurina (6-BAP) y la auxina Ácido Indolacético (AIA).

En los BIMOT la inmersión de los tejidos se realizó en un solo recipiente de material de policarbonato con capacidad de siete litros, al que se le inyectó aire comprimido para garantizar que el medio de cultivo líquido además de oxigenarse, tuviera movimientos ondulatorios que contribuyeran a que los tejidos se humedecieran. Al fondo de cada BIMOT se colocó una plataforma de aluminio junto con una malla plástica que sirve de soporte a los tejidos. La entrada

del flujo de aire se realizó a una presión de salida de 0.2 bar para impulsar el medio líquido durante el periodo de inmersión. En la Figura 2, se presenta el modelo de biorreactor BIMOT.

Sobre la tapa plástica del recipiente se colocaron fijamente dos filtros de acetato de celulosa para evitar la contaminación de microorganismos dentro de los biorreactores.



Figura 2. Modelo de biorreactor BIMOT. UNA, 2023.

Para este estudio se utilizó un BIMOT por cada variante de medio, a cada uno se le agregó 1000 ml L⁻¹ de medio de cultivo de consistencia líquida y se aplicó a los tejidos una frecuencia de inmersión de una cada 24 horas con un tiempo de tres minutos. Se empleó una densidad de siembra de 60 tejidos por biorreactor. Los tratamientos se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Variantes de medio de cultivo en la fase de multiplicación

Variantes de medios	*6-BAP (mg L⁻¹)	**AIA (mg L⁻¹)
1	2.00	0.65
2	2.00	0.00
3	2.25	0.65
4	2.25	0.00
5	2.50	0.65
6	2.50	0.00

*6 Bencil amino purina

**Ácido indolacético.

a) Variables evaluadas

La evaluación se realizó a las tres semanas de establecido el experimento tomando 25 plantas al azar por cada tratamiento. Las variables evaluadas fueron:

- i. Longitud de brote principal (cm): Se hizo la medida con una regla milimétrica desde la parte superior del microcormo hasta la zona de unión peciolo-vaina de la primera hoja.
- ii. Número de hojas por planta: Se contó la totalidad de hojas producidas.
- iii. Números de brotes axilares: Se contabilizaron todos los brotes producidos por cada tejido.

b) Diseño de experimento

El experimento se estableció en un Diseño Completo al Azar (DCA) al que se le realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan $\alpha = 0.05$. Los datos se procesaron y analizaron en el paquete estadístico INFOSTAT versión 2020.

4.4.2. Experimento 2. Tipos de tejidos y su efecto en el número de brotes

En el segundo experimento se evaluó el crecimiento de las plantas formadas por el efecto de la siembra en BIMOT de diferentes tipos de tejidos: a) tejido principal individual obtenido de plantas *in vitro* debidamente formadas, b) tejido principal con un brote axilar y 3) tejido principal con dos brotes axilares. La densidad de siembra utilizada fue de 60 tejidos por biorreactor.

A los tres tipos de tejidos se les cortó el pseudotallo transversalmente reduciéndolos a una longitud aproximada de 1 cm arriba del corte basal. Sandoval, (1989) nombró como pseudotallo a la zona de las hojas enrolladas desde la parte superior del micro-cormo de la planta *in vitro* hasta la zona de transición peciolo-vaina de la hoja más joven abierta.

Como medio de cultivo se utilizó la mejor variante obtenida en el Experimento 1, también un biorreactor por cada tratamiento e igual frecuencia y tiempo de inmersión. En la Figura 3, se presentan los tres tipos de tejidos definidos para el estudio en fase de multiplicación.

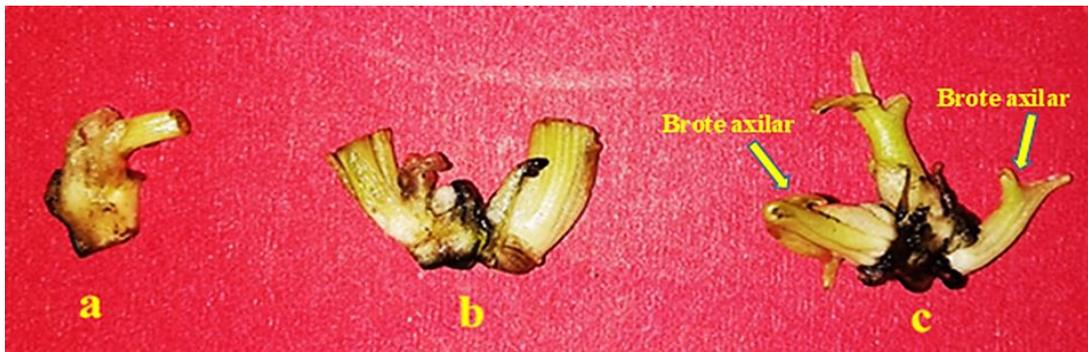


Figura 3. a) siembra con un brote, b) siembra de dos brotes, c) siembra de tres brotes.

a) Variables evaluadas

La evaluación de las plantas se realizó a las tres semanas después de la siembra. Se evaluaron iguales variables a las descritas en el inciso a) del Experimento 1.

b) Diseño de experimento

El diseño estadístico, procesamiento de los datos y paquete estadístico utilizados, fueron iguales a los descritos en el inciso b) del Experimento 1.

4.4.3. Experimento 3. Efecto de la densidad de siembra en el crecimiento de las plantas

En este experimento se evaluó la respuesta en el crecimiento de las plantas por el efecto de las siembras de cuatro densidades de tejidos (50, 60, 70 y 80) por BIMOT de capacidad siete litros al que se le agregaron 1000 ml L^{-1} de medio de cultivo líquido con iguales constituyentes a los adicionados en el Experimento 2. Para el estudio se tomaron plantas formadas también producto de ese experimento. Cada densidad de siembra estudiada corresponde a un tratamiento.

La variante de medio de cultivo, la frecuencia y tiempo de inmersión fue igual a la descrita en el Experimento 1.

a) Variables evaluadas

Se evaluó con igual metodología y variables a las descritas en el inciso a) del Experimento 1.

b) Diseño de experimento

El diseño estadístico, el tiempo de evaluación, el procesamiento de los datos y el paquete estadístico fueron iguales a los empleados en el Experimento 1.

4.5. Fase de enraizamiento

4.4.1. Experimento 4. Efecto de la hormona AIA en la formación de raíces

A las plantas obtenidas en el Experimento 3, se les realizó cortes transversales en el pseudotallo a 1 cm aproximadamente de la base; se eliminaron las raíces de cada una, la densidad de siembra utilizada se seleccionó en base a la mejor respuesta obtenida en el estudio de las cuatro densidades de siembra descritas en el Experimento 3. A las cuatro semanas después de la siembra, se evaluó la respuesta de las plantas en base a la expresión morfológica de las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y número de raíces por efecto de la hormona AIA. Para el estudio de esta, se emplearon tres variantes: 0.00, 0.50 y 1.00 mg L⁻¹. En el Cuadro 2, se describen los tratamientos.

Cuadro 2. Variantes de medio de cultivo empleados en la fase de enraizamiento

Variantes de medios	AIA (mg L ⁻¹)
1	0.00
2	0.50
3	1.00

a) Variables evaluadas

La evaluación de las plantas se realizó a las cuatro semanas de establecido el experimento tomando 25 plantas al azar por cada tratamiento. Las variables evaluadas fueron:

- i. Longitud del pseudotallo (cm): Se hizo la medida con una regla milimétrica desde la parte superior de microcormo hasta la zona de unión peciolo-vaina de la primera hoja.
- ii. Número de hojas por planta: Se contó la cantidad de hojas producidas.
- iii. Números de raíces: Se contabilizaron todas de raíces producidas en el microcormo.

b) Diseño del experimento

El diseño estadístico, el análisis, el procesamiento de los datos y el paquete estadístico fueron iguales a los empleados en los experimentos uno, dos y tres.

4.6. Fase de aclimatación

4.5.1. Experimento 5. Respuesta de las vitroplantas de plátano cv. Enano al bioestimulante Protifert 56 LMW

El Protifert 56 LMW es un bioestimulante orgánico de rápida absorción, con alto y balanceado contenido de aminoácidos y péptidos que al entrar en contacto con la planta producen rápidas y consistentes mejoras en toda su actividad de crecimiento y desarrollo. Estimula el metabolismo general de las plantas, logrando una mayor absorción, movilización y aprovechamiento de los nutrientes disponibles en el suelo. La composición de aminoácidos y péptidos es: 32.75 %, potasio (K₂O) 20.90 % y nitrógeno orgánico 5.00 %. (Rappacciolli McGregor, S.A [RAMAC], 2021)

El estudio con el bioestimulante se realizó en plantas *in vitro* que previamente se clasificaron en tres tamaños de acuerdo a la longitud del pseudotallo: a) pequeñas de 1 a 3 cm; b) medianas de 3.1 a 5 cm y c) grandes mayores a 5 cm. En los tres tamaños las plantas tenían entre tres y cuatro hojas formadas. La siembra se realizó en tres bandejas plásticas cada una con 60 orificios. Las dimensiones de cada orificio fueron: altura de 5 cm, diámetro superior 5 cm y diámetro inferior 2.5 cm. Por cada bandeja se sembraron 60 plantas de las cuales 20 correspondieron a plantas pequeñas, 20 medianas y 20 grandes. Se utilizó compost como sustrato.



Figura 4. Clasificación de plantas por tamaños.

En cada bandeja se evaluó una dosis determinada del bioestimulante y el testigo, se implementó un tratamiento diferente por bandeja respectivamente. La evaluación se hizo a las dos semanas después del establecimiento.

En el estudio del bioestimulante se utilizó un testigo (0.0 ml L⁻¹) y las dosis 0.25 y 0.50 ml L⁻¹, cada dosis corresponde a un tratamiento diferente. El producto fue diluido en un litro de agua y se asperjó sobre las plantas con una frecuencia de aplicación cada cinco días. Las plantas se irrigaron diariamente a excepción de los días en los que se aplicó el bioestimulante.

a) Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron iguales a las descritas en el inciso a) del Experimento 4, además se evaluó la supervivencia. Sin embargo, en este estudio solo se tomaron 15 plantas por tamaño y tratamiento en cada bandeja.

b) Diseño de experimento

El diseño estadístico, el procesamiento de los datos y el paquete estadístico utilizado fue igual a los empleados en los experimentos anteriores.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Fase de multiplicación de plátano cv. Enano en BIMOT

5.1.1. Experimento 1. Medios de cultivos y su efecto en el crecimiento de las plantas

En la variable longitud del pseudotallo principal cuando se agregaron 2 mg L⁻¹ de BAP se obtuvo una media de 1.36 cm resultando estadísticamente inferior únicamente a la media de 2.01 cm que se logró en el medio de cultivo que contenía 2.50 mg L⁻¹ de BAP con 0.65 mg L⁻¹ de AIA. En la variable número de hojas en los seis tratamientos no se presentaron diferencias estadísticas entre las medias. En la variable número de brotes el tratamiento que se le adicionó 2.5 mg L⁻¹ de BAP resultó superior en relación a los tratamientos que solo se adicionaron 2 mg L⁻¹ solo o combinado con 0.65 mg L⁻¹ de AIA y a los que se agregaron 2.25 mg L⁻¹ de BAP y 2.50 mg L⁻¹ de BAP con 0.65 mg L⁻¹ de AIA. Los resultados de las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y de brotes se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Resultados de las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y brotes en seis variantes de medios de cultivo en la fase de multiplicación de plátano cv. Enano evaluadas a las tres semanas

Tratamiento	BAP (mg L ⁻¹)	AIA	Longitud del pseudotallo (cm)	Número de hojas	Número de brotes
T ₁	2.00	0.65	1.36 b	1.48 a	1.72 d
T ₂	2.00	0.00	1.66 ab	1.96 a	1.92 cd
T ₃	2.25	0.65	1.89 ab	1.28 a	6.16 ab
T ₄	2.25	0.00	1.79 ab	1.56 a	4.36 b
T ₅	2.50	0.65	2.01 a	1.60 a	4.16 bc
T ₆	2.50	0.00	1.96 ab	1.93 a	7.44 a

Medias con letras diferentes dentro de cada columna difieren para $p \leq 0.05$.

Considerando que en el estudio solo se presentaron resultados del primer y único subcultivo haciendo uso de biorreactores (BIMOT) en la fase de multiplicación plátano cv. Enano, se valora como bueno el estímulo en la brotación axilar producido por la adición de 2.25 mg L⁻¹ de BAP con 0.65 mg L⁻¹ de AIA o solo 2.50 mg L⁻¹ de BAP con medias respectivas de 6.16 y 7.44.

En este estudio se empleó un balance de dosis bajas de los reguladores de crecimiento (BAP y AIA) considerando la recomendación de Evans y Bravo (1985): que es necesario ser cuidadoso en el manejo de los reguladores de crecimiento en la fase de multiplicación, porque al usar altas

concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo se puede inducir a la formación de yemas adventicias consideradas como fuente de variantes genéticas.

Pérez-Alonso *et al.* (2015) enfatizan que “el balance apropiado de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo, está determinado por las concentraciones endógenas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante” (p. 10). “Si bien con citoquinina sola se logran niveles adecuados de proliferación de brotes, se puede incluir auxina (0.1- 0.2 mg L⁻¹) siempre y cuando se mantenga una proporción alta de citoquinina” (Vuylsteke,1989).

En este estudio los resultados en número de brotes por planta superaron los mayores promedios que se alcanzaron en el segundo subcultivo de la investigación de Chavarría y López (2010) en plátano Cuerno Gigante, donde al adicionar 2 mg L⁻¹ de BAP y la combinación 2 mg L⁻¹ de BAP con 0.25 mg L⁻¹ de AIA alcanzaron promedios de brotación respectivos de 3.28 y 3.12. También, superó los resultados obtenidos por Castro y Maradiaga (2015), con el cv. CEMSA ¾ donde empleando los Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) obtuvieron mejor brotación en el tercer subcultivo con adiciones de 3 mg L⁻¹ de BAP combinado con 0.25 mg L⁻¹ de AIA con media de 4.55 brotes axilares.

No se lograron los resultados reportados por Basail *et al.* (2006) estudiando la multiplicación *in vitro* del cultivar híbrido ‘FHIA-21’ (AAAB) con el empleo del Sistema de Inmersión Temporal (SIT) compuesto por dos frascos de cultivo de 10 litros de capacidad, uno para el crecimiento de los explantes y el otro como reservorio de medio de cultivo donde obtuvieron una media de brotación axilar de 11.96 en el medio de cultivo constituido con 2 mg L⁻¹ de BAP y 0.65 mg L⁻¹ de AIA.

Además del genotípico que puede determinar las concentraciones más adecuadas de reguladores del crecimiento aplicados solos o en combinación para lograr una óptima brotación axilar en el cultivo de plátano, existen otros factores que influyen en esa respuesta como es el número de subcultivos y es así, que resultados reportados por Caldera y López (2002) en la micropropagación de cv. Enano concluyeron que con adiciones entre 2 y 5 mg L⁻¹ de BAP combinadas con 0.30 mg L⁻¹ de AIA entre el tercero y quinto subcultivo obtuvieron mayor brotación con medias entre 4.8 y 8.2 brotes axilares.

5.1.2. Experimento 2. Tipos de tejidos y su efecto en el número de brotes

En bananos y plátanos se reportan diferentes rangos de multiplicación en dependencia del genotipo, del tipo de explante, de la composición del medio nutritivo y del manejo empleado. (Orellana, 1995)

El uso de citoquininas es generalizado en los medios de propagación, variando su concentración en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes (Hu y Wang, 1983).

El medio de cultivo empleado en este experimento contenía 2.5 mg L⁻¹ de BAP con el que se obtuvo mejor respuesta de brotación axilar de acuerdo al Experimento 1. En longitud de pseudotallo se presentaron diferencias resultando superiores estadísticamente cuando se sembraron dos y tres brotes axilares con medias respectivas de 1.91 y 2.06 cm; mientras que con la siembra de un brote axilar la media de la longitud del pseudotallo fue de 1.41 cm.

En las variables número de hojas y de brotes no se presentaron diferencias significativas con la siembra de uno, dos y tres brotes axilares. Los resultados se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Respuesta de las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y de brotes por efecto de la siembra de uno, dos y tres brotes axilares en la fase de multiplicación evaluadas a las tres semanas

Número de brotes por explante	Variables evaluadas		
	Longitud del pseudotallo (cm)	Número de hojas	Número de brotes
Un brote	1.41 b	2.12 a	6.40 a
Dos brotes	1.91 a	2.24 a	7.80 a
Tres brotes	2.06 a	2.04 a	8.36 a

Medias con letras diferentes dentro de cada columna difieren para $p <= 0.05$.

Los mejores resultados en la variable longitud del pseudotallo con dos y tres brotes concuerda con lo planteado por Calderón-Baltierra (1994), donde expresa que cuando hay menor disponibilidad de citoquininas entre los brotes se reduce la división celular y se promueve la altura del tejido.

Otra expresión morfológica no evaluada en el estudio que evidenció el efecto del vigor en las plantas con la siembra de explantes con dos y tres brotes, fue en las hojas de los brotes axilares

producidos a las tres semanas que presentaron mayor expansión del limbo como se aprecia en la Figura 5.



Figura 5. Plantas de plátano cv. Enano mostrando hojas vigorosas a las tres semanas de evaluación en BIMOT.

En el presente estudio el objetivo propuesto fue evaluar el efecto en la brotación axilar cuando se inoculan solo el tejido principal con un brote axilar y el tejido principal con dos brotes axilares. Se estiman satisfactorios los resultados alcanzados, porque se obtuvieron a las tres semanas de permanecer los tejidos en los biorreactores 8.36 brotes axilares con el tipo de tejido principal y dos brotes axilares.

El empleo de dosis bajas de 6-BAP (2.5 mg L^{-1}) garantiza mayor estabilidad genética de las plantas cuando el propósito de la micropropagación es la producción masiva de plantas. En este sentido Murashige (1974) y Hu y Wang (1983) reportan que para la brotación de yemas axilares es recomendable utilizar altas concentraciones de citoquininas, adicionando a menudo bajas dosis de auxina que, aunque no aumenten las tasas de multiplicación, si mejora el crecimiento de los brotes.

Orellana (1995), como práctica de manejo de los tejidos en la micropropagación de plátanos y bananos para lograr mejores coeficientes de multiplicación recomienda el corte longitudinal y decapitado de los micro-cormos, práctica que también la reportan diferentes autores entre ellos Hwang *et al.* (1984) que utilizando explantes de ápices meristemáticos decapitados (corte transversal) y con un brote, lograron promedios de cinco a 10 brotes axilares por cada explante

después de seis a ocho semanas, promedios considerados como similares a los obtenidos en cuatro semanas en el presente estudio con manejos similares en el corte de los explantes.

Gupta (1986) recomienda la práctica de aplicar una serie de cortes verticales en el domo meristemático, el número de incisiones puede oscilar entre dos y 10, se realizan de forma que se mantenga intacta la base del explante, la técnica puede aumentar en gran medida el ennegrecimiento del explante y del medio de cultivo, pero se puede evitar agregando ácido ascórbico al medio.

Martínez *et al.* (2009) con el cv. de banano ‘Grande naine’ y los cvs. de plátano ‘FHIA 18’ y ‘FHIA 21’ realizaron la práctica de corte longitudinal al micro-corno hasta el domo apical, sin cortar transversalmente el pseudotallo inocularon en un medio de cultivo que contenía las sales MS, 4.0 g L⁻¹ de agar, 0.65 mg L⁻¹ de AIA, 30 g L⁻¹ de sacarosa, así como 4.0 y 3.0 mg L⁻¹ de 6-BAP, logrando un incremento significativo en el número de brotes por explante en todos esos cultivares. Además, las plantas formadas fueron de mayor altura y por eso sugieren transferirlas a la fase de enraizamiento en medios de cultivo líquidos.

5.1.3. Experimento 3. Efecto de la densidad de siembra en el desarrollo de las plantas

El estudio consistió en evaluar el efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento de las plantas cuando se emplea un BIMOT por cada densidad de 50, 60, 70 y 80 brotes por biorreactor.

Únicamente la densidad de siembra de 60 brotes por BIMOT superó estadísticamente en longitud de pseudotallo a la densidad de 80 brotes con medias respectivas de 1.70 y 1.30 cm. Entre las siembras de las densidades de 50, 70 y 80 no se presentaron diferencias significativas.

Densidades de 50 y 60 brotes con medias respectivas de 2.12 y 2.04 en el número de hojas registraron mejor comportamiento estadístico en relación con las densidades de 70 y 80 brotes que obtuvieron medias correspondientes de 1.74 y 1.64.

Con densidades de siembra de 60, 70 y 80 brotes no se presentaron diferencias significativas entre sí logrando medias respectivas de 6.64, 6.80 y 7.00 en el número de brotes como se observa en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Respuesta de las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y de brotes por efecto de la densidad de siembra de 50, 60, 70 y 80 brotes axilares en la fase de multiplicación evaluadas a las tres semanas

Densidad de siembra	Variables evaluadas		
	Longitud del pseudotallo (cm)	Número de hojas	Número de brotes
50	1.64 ab	2.12 a	5.72 b
60	1.70 a	2.04 a	6.64 a
70	1.40 ab	1.72 b	6.80 a
80	1.30 b	1.64 b	7.00 a

Medias con letras diferentes dentro de cada columna difieren para $p \leq 0.05$.

Orellana (1998b) puntualizó la necesidad de “valorar experimentalmente la densidad de explantes por frasco porque este parámetro pudiera ocasionar deficiencias en el sistema; ya que una baja densidad ocasionaría pérdidas de espacio y de medio de cultivo” (p. 105).

Por otra parte, Basail *et al.* (2011) evidenciaron que con el uso de un SIT con frascos Nalgene de 10 litros de capacidad se obtuvieron mejores resultados en el coeficiente de multiplicación al utilizar densidades de 60, 80 y 100 explantes por frasco, obteniendo 13.60, 13.82 y 13.73 brotes respectivamente a las tres semanas de cultivo; concluyeron que existe una mayor asimilación de nutrientes y aprovechamiento de espacio al utilizar densidades altas no mayor a 80 explantes por frasco.

Mientras que en Basail *et al.* (2013) reportan que en plátano cv. “INIVITPV-2011” (AAB) micro propagados en biorreactores con SIT aplicando un tiempo de 10 minutos de inmersión y una frecuencia cada tres horas (ocho inmersiones al día), con una densidad de inóculo de 60 explantes, un volumen de 3600 ml L⁻¹ de medio de cultivo y un tiempo de cultivo de 18 días se lograron los mejores resultados en coeficiente de multiplicación (8.45 brotes), número de hojas activas (2.58) y en altura del explante (1.98 cm).

En los resultados por Basail *et al.* (2015) confirmaron sus aportes realizados en años anteriores donde utilizaron explantes del plátano vianda cv. ‘INIVIT PV-2011 propagados en biorreactores Nalgene® de 10 litros de capacidad, al igual que el estudio anterior, encontraron mejores resultados en densidades de 60 y 80 explantes por frasco a las tres semanas de cultivo, ellos

concluyeron que se seleccionó la densidad de 60 explantes por frasco de cultivo teniendo en cuenta que los explantes tenían menor grado de oxidación y mayor altura” (p. 180).

En comparación a los resultados obtenidos con el uso de biorreactores BIT reportado por Basail *et al.* (2013) y de las especificaciones técnicas de los biorreactores SETIS® explicadas por Gil (2019), el modelo de biorreactor BIMOT presenta las siguientes ventajas: a) el armado y el funcionamiento es más sencillo, b) al utilizar un solo recipiente por cada sistema de biorreactor se reduce significativamente el consumo de energía eléctrica porque necesita menor tiempo y frecuencia de inmersión, y c) los materiales con los que está estructurado el sistema son de menor costo.

Los resultados alcanzados con los biorreactores BIMOT con capacidad de siete litros de volumen demuestran que la tecnología es viable para la producción masiva de plátano cv. Enano, porque se obtuvieron efectos positivos con menor cantidad de medio de cultivo adicionado a cada biorreactor (1000 ml L^{-1}), menor frecuencia de inmersión de los tejidos de una cada 24 horas y menor tiempo de inmersión (tres minutos).

En la Figura 6, se observan las plantas obtenidas con un crecimiento normal y sin síntomas de hiperhidricidad a las tres semanas.

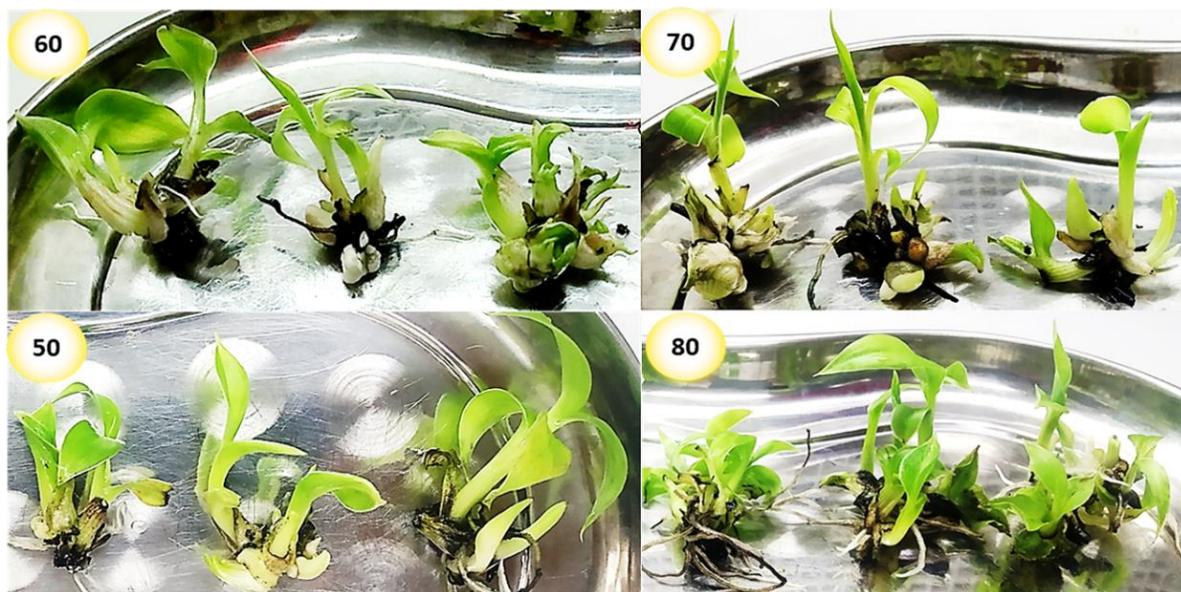


Figura 6. Efecto en la brotación axilar de las densidades de siembra de 50, 60, 70 y 80 brotes de plátano cv. Enano a las tres semanas de crecimiento en BIMOT.

5.2 Fase de enraizamiento

5.2.1. Experimento 4. Efecto de la hormona AIA en la formación de raíces

En esta fase los brotes obtenidos durante la etapa de multiplicación crecen en laboratorio hasta formar plantas completas con sistema radical que les permite ser trasplantadas a condiciones de vivero o invernadero durante siete a diez semanas (Krikorian & Cronauer, 1984, y Vuylsteke & De Langhe, 1985).

No se presentaron diferencias estadísticas en la variable longitud del pseudotallo con las adiciones 0.50 y 1.00 mg L⁻¹ de AIA con medias correspondientes de 4.22 y 3.70 cm, pero con esas longitudes alcanzadas resultaron significativamente superiores a la media de 2.78 cm que se obtuvo cuando no se adicionó AIA. El comportamiento estadístico de las medias de longitud del pseudotallo se presenta en la Figura 7.

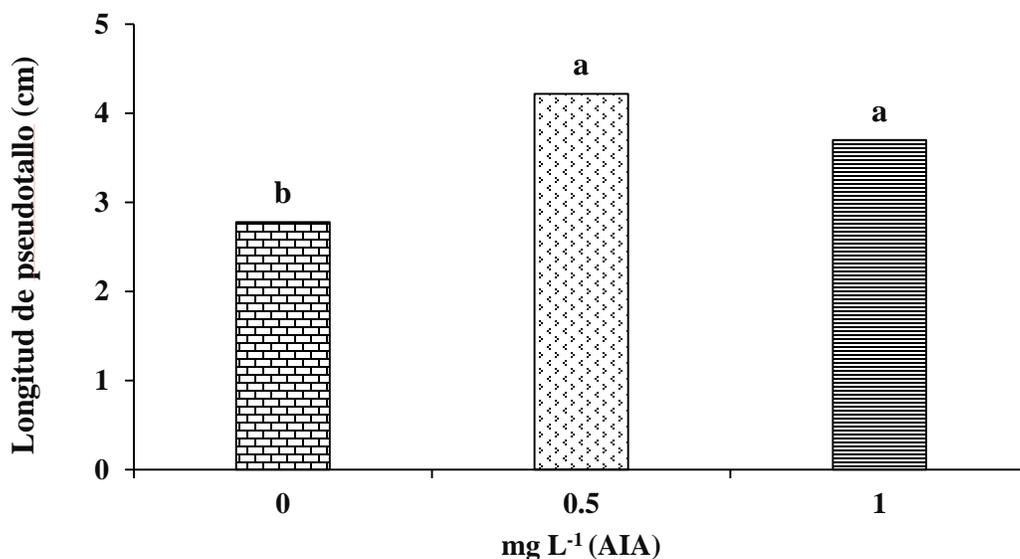


Figura 7. Efecto en la longitud del pseudotallo por la adición de distintas concentraciones de AIA, en plátano cv. Enano. Letras desiguales difieren para $p \leq 0.05$.

Entre las medias de la variable número de hojas no se registraron diferencias significativas como se presenta en la Figura 8.

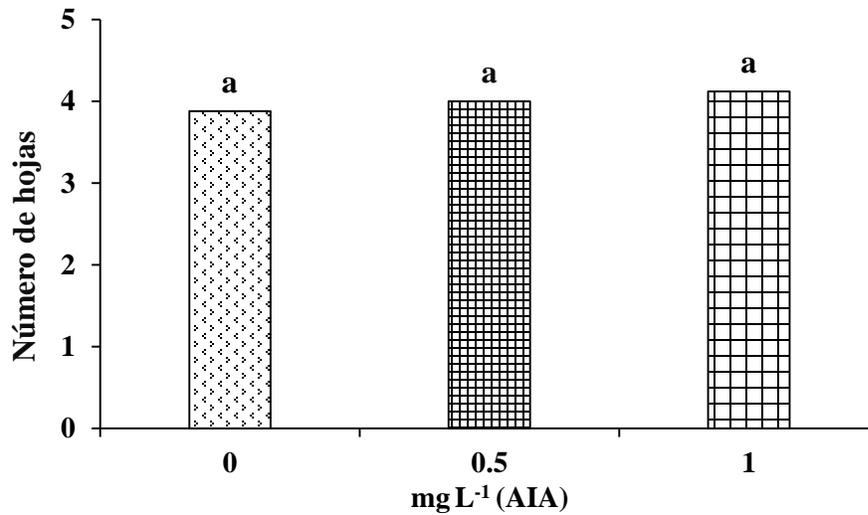


Figura 8. Efecto en el número de hojas por la adición de distintas concentraciones de AIA, en plátano cv. Enano. Letras desiguales difieren para $p \leq 0.05$.

En número de raíces el tratamiento que se le agregó 1.00 mg L⁻¹ con media de 8.08 resultó estadísticamente superior a las medias de 2.92 y 6.72 logradas con el testigo 0.00 mg L⁻¹ y la adición 0.50 mg L⁻¹ de AIA respectivamente. La respuesta estadística de las medias de número de raíces se presenta en la Figura 9.

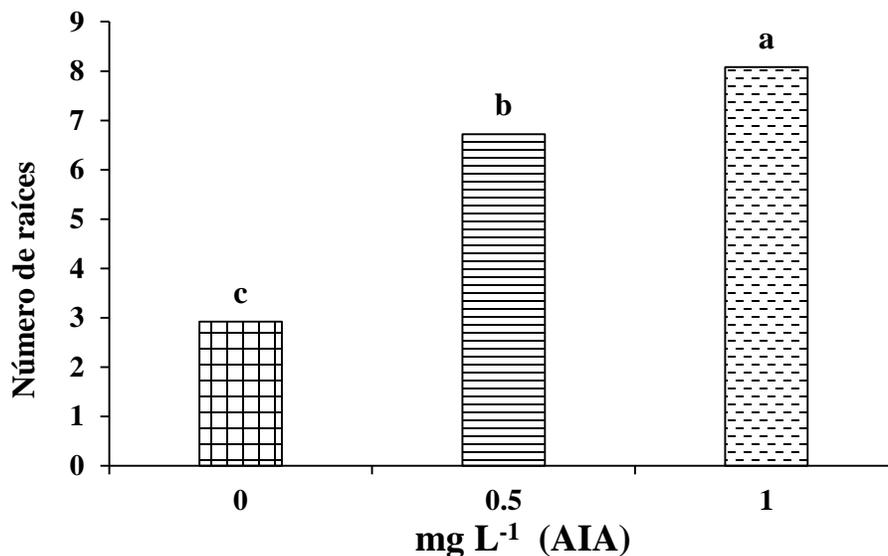


Figura 9. Efecto en el número de raíces por la adición de distintas concentraciones de AIA, en plátano cv. Enano. Letras desiguales difieren para $p \leq 0.05$.

En la Figura 10, se observan plantas que crecieron en la fase de enraizamiento durante cuatro semanas con el testigo 0.00 y las adiciones de la hormona vegetal AIA en concentraciones de 0.50 y 1.00 mg L⁻¹ de AIA.



Figura 10. Efecto de las concentraciones de AIA: a) 0.00 mg L⁻¹ b) 0.50 mg L⁻¹ c) 1.00 mg L⁻¹ en la fase de enraizamiento en BIMOT.

Los resultados muestran que el diseño y funcionamiento del biorreactor BIMOT influye en el estímulo del crecimiento de los tejidos, no obstante, se evidencia que al adicionar cualquiera de estas dos concentraciones de AIA a los medios de cultivos contribuyen significativamente a la emisión de raíces y la longitud del pseudotallo.

Estos resultados superaron las medias obtenidas en las variables evaluadas en la fase de enraizamiento por Castro y Maradiaga (2015) en el modelo BEIT en el cv. de plátano CEMSA ¾ logrando los mejores resultados de plantas enraizadas con la adición de 0.75 mg L⁻¹ de AIA con media de 5.21, mientras que en este estudio se alcanzó una media de raíces producidas de 8.08 con la adición de 1 mg L⁻¹ de AIA.

En la fase evaluada a los 30 días en la variable longitud de pseudotallo se lograron resultados en el rango entre 2.78 y 4.22 cm, superando a los resultados reportados por Chavarría y López (2010) que emplearon medios de cultivo de consistencias líquida y semisólida, con adiciones de 30 g L⁻¹ de sacarosa y 0.00, 0.50 y 1.00 mg L⁻¹ de AIA en plátano cv. “Gigante” obteniendo medias de longitud del pseudotallo en el rango entre 2.59 y 4.03 cm después de evaluadas a los 30 días.

Además de los constituyentes que se adicionaron de los medios de cultivo, el empleo del modelo de biorreactor BIMOT tuvo influencia en el crecimiento de las plantas tanto en la fase de multiplicación como en la de enraizamiento contribuyendo positivamente a la expresión morfológica de las variables evaluadas, longitud de pseudotallo, número de hojas, número de

brotos axilares y número de raíces producidas, además se observó buen vigor y una coloración verde manzana en las plantas.

5.3 Fase de aclimatación

5.3.1. Experimento 5. Respuesta de las vitroplantas de plátano cv. Enano al bioestimulante Protifert 56 LMW

a) *Tamaño de vitroplantas de plátano cv. Enano con categoría pequeña*

Las plantas clasificadas como categoría pequeña presentaron diferencias estadísticas en las medias de las variables longitud del pseudotallo y en número de hojas. Las dosis de 0.25 y 0.50 ml L⁻¹ con medias respectivas de 6.20 y 6.44 cm, superaron significativamente a la media de 5.10 cm obtenida en el tratamiento testigo. En número de hojas el tratamiento al que se le adicionó 0.50 ml L⁻¹ de Protifert logró una media de 4.95 hojas que fue superior a las medias de 4.40 y 4.00 producidas en los tratamientos con 0.25 ml L⁻¹ y el testigo respectivamente.

El porcentaje de supervivencia fue del 100 % en los tres tratamientos. En el Cuadro 6, se presentan los resultados del análisis de diferencias de medias de Duncan en las variables longitud del pseudotallo, número de hojas, número de raíces y el porcentaje de supervivencia.

Cuadro 6. Respuesta de plantas pequeñas de plátano cv. Enano a las dosis de 0.00, 0.25 0.50 ml L⁻¹ del bioestimulante Protifert LMW a las dos semanas de aclimatadas

Tratamientos	Variables evaluadas				
	Fertilizante orgánico (ml L ⁻¹)	Longitud del pseudotallo (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Supervivencia (%)
T ₁	0.00	5.10 b	4.00 c	3.40 a	100
T ₂	0.25	6.20 a	4.40 b	4.05 a	100
T ₃	0.50	6.44 a	4.95 a	4.25 a	100

Medias con letras diferentes dentro de cada columna difieren para p ≤ 0.05.

Considerando que las plantas pequeñas se sembraron en el sustrato compost con una longitud del pseudotallo de aproximadamente 3 cm, estas alcanzaron a las dos semanas de aclimatadas un incremento promedio de 2.10 cm en el caso del tratamiento testigo y de 3.20 y 3.44 con las aspersiones de Protifert LMW. Además, se estimuló la emisión de hojas en las plantas

principalmente con las adiciones de 0.25 y 0.50 ml L⁻¹ del bioestimulante con medias respectivas 1.40 y 1.95 hojas en relación al promedio de 3 hojas al momento de la siembra de las plantas.

b) Tamaño de vitroplantas de plátano cv. Enano con categoría mediana

La adición de Protifert 56 LMW en dosis de 0.25 y 0.50 ml L⁻¹ permitieron que las plantas alcanzaran longitudes del pseudotallo superiores a los 9 cm con medias respectivas de entre 9.03 y 9.30 cm que resultaron significativamente superiores a la media de 8.49 cm obtenida en el tratamiento testigo. Con media de 5.45 en número de hojas por efecto de la dosis de 0.50 ml L⁻¹ de Protifert 56 LMW resultó estadísticamente superior a la media de 5.15 hojas obtenidas en el tratamiento testigo. Con dosis de 0.25 y 0.50 ml L⁻¹ del producto, el comportamiento de las medias de número de hojas fue similar.

El mejor comportamiento estadístico entre las medias para número de raíces se logró con la aplicación de la dosis de 0.50 ml L⁻¹ de Protifert 56 LMW con 9.95 raíces. En los tres tratamientos la emisión de raíces fue superior a cinco y la supervivencia de las plantas fue del 100 %. En el Cuadro 7, se presentan los resultados.

Cuadro 7. Respuesta de plantas medianas de plátano cv. Enano a las dosis de 0.00, 0.25 0.50 ml L⁻¹ del bioestimulante Protifert LMW a las dos semanas de aclimatadas

Tratamientos	Variables evaluadas				
	Fertilizante orgánico (ml L ⁻¹)	Longitud del pseudotallo (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Supervivencia (%)
T ₁	0.00	8.49 b	5.15 b	5.05 b	100
T ₂	0.25	9.03 a	5.20 ab	5.30 b	100
T ₃	0.50	9.30 a	5.45 a	5.95 a	100

Medias con letras diferentes dentro de cada columna difieren para p<= 0.05.

c) Tamaño de vitroplantas de plátano cv. Enano con categoría grande

Con media de 13.44 cm en longitud del pseudotallo por efecto de la dosis de 0.50 ml L⁻¹ de Protifert 56 LMW resultó estadísticamente superior a la media de 12.34 cm lograda en el tratamiento testigo, sin embargo, las dosis 0.25 y 0.50 ml L⁻¹ del fertilizante, presentaron resultados similares con medias de 12.83 y 13.44 cm respectivamente.

Las medias de número de hojas y número de raíces con dosis de 0.25 y 0.50 ml L⁻¹ de Protifert fueron estadísticamente similar y en ambas concentraciones se lograron medias superiores en el número de raíces en comparación con el tratamiento testigo. En el Cuadro 8, se presentan los resultados del comportamiento estadístico de las variables longitud del pseudotallo, número de hojas, número de raíces y porcentaje de supervivencia.

Cuadro 8. Respuesta de plantas grandes de plátano cv. Enano a las dosis de 0.00, 0.25 0.50 ml L⁻¹ del bioestimulante Protifert LMW a las dos semanas de aclimatadas

Tratamientos	Variables evaluadas				
	Fertilizante orgánico (ml L ⁻¹)	Longitud (cm)	Número de hojas	Número de raíces	Supervivencia (%)
T ₁	0.00	12.34 b	5.60 b	6.11 b	100
T ₂	0.25	12.83 ab	5.90 ab	7.20 a	100
T ₃	0.50	13.44 a	6.10 a	7.45 a	100

Medias con letras diferentes dentro de cada columna difieren para $p \leq 0.05$

Los resultados obtenidos en la fase de aclimatación indican que durante el crecimiento las plantas de plátano cv. Enano responden favorablemente a las adiciones de 0.25 y 0.50 ml L⁻¹ del bioestimulante Protifert LMW, producto que puede ser aplicado como rutina en la aclimatación de mayores cantidades de plantas, adicionado a esto, este fertilizante no produjo síntomas adversos en la coloración de las hojas y el pseudotallo, ni en la calidad, tamaño y volumen de las raíces formadas. (Ver Figura 11)

Con la supervivencia del 100 % que presentaron las plantas aclimatadas en el tratamiento que no se le adicionó el bioestimulante Protifert LMW se demuestra que el sustrato compost tiene la textura y los nutrientes adecuados para la aclimatación plátano cv. Enano.

Canchignia *et al.* (2008) en fase de aclimatación de plátano cv. Maqueño (*Musa balbisiana* AAB) experimentaron solamente con los sustratos: tierra de sembrado, arena, cascarilla de arroz y carboncillo, encontrando diferencias estadísticas significativas con promedios superiores en el sustrato tierra de sembrado en las variables evaluadas de diámetro de pseudotallo con 0.60 cm, altura de planta con 10.70 cm, longitud de raíz mayor 6.10 cm y sobrevivencia del 80 % de plantas aclimatadas.



Figura 11. Plantas grandes mayores de 5 cm, plantas medianas entre 3.1- 5 cm y plantas pequeñas entre 1-3 cm.

VI. CONCLUSIONES

En la fase de multiplicación con el empleo del biorreactor BIMOT las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y número de brotes presentaron mejor respuesta estadística en los medios de cultivo que contenía la combinación de 2.25 de mg L^{-1} de BAP con 0.65 mg L^{-1} de AIA y con solo 2.50 mg L^{-1} de BAP.

La siembra de dos y tres brotes axilares en BIMOT presentaron similar respuesta estadística en las variables longitud del pseudotallo, el número de hojas y el número de brotes axilares.

Con densidades de siembra de 60, 70 y 80 brotes en BIMOT se favoreció el incremento del número de brotes axilares producidos a las tres semanas. Sin embargo, en base a los resultados en las variables evaluadas, se encontró una mejor respuesta al inocular una densidad de 60 explantes por biorreactor.

Con la adición de 1.00 mg L^{-1} de AIA se obtuvo la mejor respuesta en número de raíces a las cuatro semanas en el modelo de biorreactor BIMOT.

En la fase de aclimatación las plantas de las categorías pequeñas, medianas y grandes con dosis de 0.50 ml L^{-1} del bioestimulante Protifert LMW presentaron mejor comportamiento estadístico en las variables longitud del pseudotallo, número de hojas y número de raíces.

VII. RECOMENDACIONES

Utilizar el biorreactor tipo BIMOT con una frecuencia de inmersión de los tejidos de una cada 24 horas y con un tiempo de inmersión de tres minutos en la micropropagación de plátano cv. Enano.

Experimentar con un número mayor de subcultivos la multiplicación de cv. Enano en BIMOT con diferentes prácticas de manejo (concentraciones de hormonas, tipo de tejido y densidad de siembra) para garantizar resultados similares en la eficiencia del biorreactor.

Incorporar la siembra en condiciones de campo con el objetivo de conocer la productividad y la estabilidad genética de las plantas propagadas.

VIII. LITERATURA CITADA

- Adelberg, J., Naylor-Adelberg, J. Y Tascan, M. (2007). Larger Plants From Liquid-Based Micropropagation: A Case Study With *Hydrangea quercifolia* Bartr. "Sikes Dwarf". *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, 57, 1-10.
- Aguilar M. y Cruz R. (2014). Propuesta de Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) para la producción de plantas *in vitro* a escala comercial. VII Edición del Premio.
- Aguilar, M., Reyes, G. y Acuña, M. (2004). Métodos alternativos de propagación de semilla agámica de plátano (*Musa sp.*). Repositorio Institucional UNA. <https://repositorio.una.edu.ni/2406/>
- Aitken-Christie, J., Kozai, T., Takayama, S. (1995). Automatización en el cultivo de tejidos vegetales. Introducción general y descripción general. En Aitken-Christie, J., Kozai, T. Smith (Eds.), *Automatización y control ambiental en el cultivo de tejidos vegetales*. (1-18). Springer. Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-015-8461-6_1
- Albarrán, J., Salazar, E., Trujillo, I., Vegas, A., González, A., Díaz, A., Vallejo, E., Castro, L., Torrealba, M., y Silva, A. (2014). Biorreactores de Inmersión Temporal para la propagación masiva de plantas. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) Maracay, Venezuela. <https://docplayer.es/80226184-Las-tecnicas-de-propagacion-vegetativa-forman.html>
- Alcántara Cortes, J., Acero Godoy, J., Alcántara Cortés, J. y Sánchez Mora, R. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *NOVA*, 17(32), 109-129. <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v17n32/1794-2470-nova-17-32-109.pdf>
- Angarita, A y Perea, M. (1984). *Avances del proyecto Estudios orientados al control de la Sigatoka negra en plátano y banano*. (Informe n° 2) Colciencias (RF1000-4-36-83). 60 p.
- Aragón, C., Escalona, M., Capote, I., Pina, D., Cejas, I. y González-Olmedo, J. (2004). Evaluación del efecto de las condiciones generadas por Biorreactores de inmersión temporal sobre enzimas y procesos clave del metabolismo del carbono en plantas *in vitro* de plátano cv. Cemsa ¾. *Biotecnología Vegetal*, 4(3), 147-152. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/413>
- Basail, M., Medero, V. y Gutiérrez, Y. (2015). Multiplicación *in vitro* de plátano vianda cv. 'Inivit Pv-2011' (*Musa* AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 15(3), 177-180. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/490>
- Basail, M., Medero, V., Torres, M., López, J., Santos, A., Rayas, A., Bauta, M., Beovidez, Y. y Ortega, A. (2013). Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda "INIVITPV-2011" (AAB). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 98-107. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77628609010>
- Basail, M., Medero, V., Otero, E., Torres, M., López, J., Cabrera, M., Santos, A., Rayas, A., Bauta, M. y Beovidez, Y. (2012). Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la propagación *in vitro* del cultivar de plátano vianda INIVITPV06-30

- (*Musa* AAB). *Biotecnología Vegetal*, 12(1), 53-57. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/rt/printerFriendly/150/html>
- Basail, M., Medero, V., Otero, E., Torres, M., Cabrera, M., López, J., Santos, A., Rayas, A., Bauta, M., Páz, E., Beovidez, Y., Ortega, A. y Pérez, J. (2011). Multiplicación *in vitro* de 'FHIA-25' (*Musa* spp., AAB) en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 11(1), 27-31. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/205/181>
- Basail, M., Kosky, R., Medero, V., Otero, E., Torres, M., Cabrera, M., López, J., García, M., Santos, A., Rayas, A., Ventura, J., Buta, M., Álvarez, M., Páz, E., Beovidez, Y., Albet, J., Espinoza, A. y García, J. (2006). Influencia de reguladores e inhibidores del crecimiento en la multiplicación de brotes axilares del cultivar híbrido 'FHIA-21' (AAAB) en Sistema de Inmersión Temporal. *Biotecnología Vegetal*, 6(1), 23-28. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/392/363>
- Caldera Caldera, L.A. y López Ruiz, J.F. (2002). *Mejoramiento de la eficiencia de Propagación In vitro de plátano (MUSA AAB cv. Enano)* [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional Agraria]. Repositorio Institucional. <https://repositorio.una.edu.ni/1835/1/tnf30c146m.pdf>
- Calderon-Baltierra, X. (1994). Influencia del calcio y ácido giberélico en el alargamiento de brotes adventicios *in vitro* de *Eucalyptus globulus*. *BOSQUE*, 15(1), 33-38. <https://doi.org/10.4206/bosque.1994.v15n1-04>
- Canchignia, H., Toaquiza, J., Ramos, L., Sigcha, L., Carranza, M., Cevallos, O. y Saucedo, S. (2008). Alternativas para la propagación *in vitro* de plátano variedad Maqueño (*Musa balbisiana* AAB). *Ciencia y Tecnología*, 1(1), 43-48. <https://revistas.uteq.edu.ec/index.php/cyt/article/view/62>
- Castillo, A. (1 de enero, 2004). *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA). <http://www.inia.uy/Publicaciones/Paginas/publicacion-1009.aspx>
- Castro Sobalvarro, C.E. y Maradiaga Sarantes, E.E. (2015). *Micropropagación tradicional y en Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal del cultivar de plátano (Musa spp.) CEMSA 3/4* [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional Agraria]. Repositorio Institucional. <https://repositorio.una.edu.ni/3282/1/tnf02c355.pdf>
- Castro, D., Días J. y Montoya, N. (2002). Propagación clonal de bananos en birreactores de inmersión temporal. En G. Hinestroza, y S. Echeverri (Eds.), Acorbat. *Memorias XV reunión realizada en Cartagena de Indias, Colombia*, 27 de octubre al 2 de noviembre de 2002. Medellín, Colombia. (pp. 44-49). Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURU)
- Cejas, I., Capote, I., Aragón, C., Escalona, M., Pina, D., González, J., Rodríguez, R., Noceda, C., Cañal, M., Sandoval, J., Roeles, S. y Debergh, P. (2011). Optimización del protocolo de propagación del plátano cv. CEMSA 3/4 en Biorreactores de Inmersión Temporal. *Agro ciencia Uruguay*, 15(1), 13-8. https://www.researchgate.net/publication/317447754_Optimizacion_del_protocolo_de_propagacion_del_platano_cv_CEMSA_frac34_en_Biorreactores_de_Inmersion_Temporal

- Chavarría Castillo, D. y López Montenegro, G. (2010). *Micropropagación de ápices caulinares en plátano (Musa sp. AAB) cultivar Cuerno Gigante* [Tesis de ingeniería, Universidad Nacional Agraria]. Repositorio Institucional. <https://repositorio.una.edu.ni/2138/1/tnf02c512m.pdf>
- Denchev, P., Kuklin, A. & Scragg, A. (1992). Somatic Embryo production in biorreactors. *Journal of Biotechnology*, 26, 99-109. https://www.researchgate.net/profile/Plamen-Denchev/publication/256434194_Somatic_embryo_production_in_bioreactors/links/5c5db34b992851c4eaba04c56/Somatic-embryo-production-in-bioreactors.pdf
- Du Jardín, P. (2019). ¿Cómo actúan los bioestimulantes para plantas? *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (313), 18-19. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7122249>
- EL 19 Digital. (27 de enero de 2023). Producción de plátano aportó a la economía 18.2 millones de dólares en Nicaragua. <https://www.el19digital.com/articulos/ver/titulo:136406-produccion-de-platano-aporto-a-la-economia-182-millones-de-dolares-en-nicaragua>.
- Etienne, H. & Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plants Cell. Tissue and Organ Culture*, 69, 215-231. https://www.researchgate.net/publication/225513071_Temporary_immersion_systems_in_plant_micropropagation
- Evans, D. A. y Bravo J. E (1985). Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. En: R. H. Zimmerman (Eds.). *Tissue culture as a plant Production System for Horticulture Crops*. (pp.73-91)
- Galán, V., Rangel, A., López, J., Pérez, J., Sandoval, J. y Souza, H. (2018). Propagación del banano: técnicas tradicionales, nuevas tecnologías e innovaciones. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40(4), 1-22. <https://doi.org/10.1590/0100-29452018574>
- García, S. (2017). Función de los Aminoácidos como Bioestimulantes. *Serie Nutrición Vegetal*, (93), 1-3.
- Gil Ruíz, H. (2019). Automatización de Sistema de Inmersión Temporal para el cultivo de vitroplantas basado en Autómata programable. [Trabajo de Diploma, Universidad Central "Martha Abreu" de Las Villas]. <https://docplayer.es/208141202-Titulo-automatizacion-de-sistema-de-inmersion-temporal-para-el-cultivo-de-vitroplantas-basado-en-automata-programable.html>
- Godoy, A., Riera, O. y Solarte, J. (2016). Plátano Hartón común: métodos de propagación. *INIA Divulga*. <https://docplayer.es/62829121-Platano-harton-comun-metodos-depropagacion-alvaro-godoy-omar-riera-y-jose-solarte.html>
- Gupta, P.P. (1986). Eradication of mosaic disease and rapid clonal multiplication of bananas and plantains through meristem tip culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*, 6, 33-39.
- Hartmann, H. T. y Kester, D. E. (1997). Propagación de plantas, principios y prácticas. Continental, México. 760 p.
- Hewstone, N. y Reyes, M. (1999). Cultivo de tejidos en la agricultura. *Tierra Adentro*, (24), 30-33. <https://biblioteca.inia.cl/handle/20.500.14001/5646> <https://hdl.handle.net/20.500.14001/5646>

- Hu, C. & Wang P. J. (1983). "Meristem, shoot tip, and bud cultures." En Macmilliam (Ed.), *Plant Cell Culture*. (pp. 177-227). Publishers Company, New York.
- Hwang, S., Chen, C., Lin, J. & Lin, H. (1984). Cultivation of Banana using Plantlets from Meristem Culture. *HortScience*, 19(2), 231-233. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.19.2231>
- Instituto Interamericano De Cooperación para La Agricultura. (2016). Vitroplantas: Una Innovación Tecnológica Eficaz. <https://www.iica.int/es/prensa/noticias/vitroplantas-una-innovacion-tecnologica-eficaz>
- Kottackal, M., Zhang, CL., Slater, A. & Madassery, J. (2007). Control of shoot necrosis and plant death during micro-propagation of banana and plantains (*Musa spp.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 88, 51-59. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9177-0>
- Krikorian, A. D. & Cronauer, S. S. (1984). Aseptic Culture Techniques for Banana and Plantain Improvement. *Economic Botany*, 38(3), 322–331. <http://www.jstor.org/stable/4254645>
- Martínez, S., Fontes-Leandro, M., Pérez Espinosa, O., Aday-Reyes, M., García-Águila, L., Rodríguez, Y. y Valdés-Moreno, A. (2009). Efecto de la forma de corte y división de los brotes sobre la multiplicación *in vitro* de tres cultivares de plátanos y bananos. *Biotecnología Vegetal*, 9(3), 183-190. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/viewFile/321/295>
- Ministerio Agropecuario. (27 de enero de 2023). Producción de plátano aportó a la economía 18.2 millones de dólares en Nicaragua. *CENIDA*. <https://cenida.una.edu.ni/index.php/2023/01/27/produccion-de-platano-aporto-a-la-economia-18-2-millones-de-dolares-en-nicaragua/>
- Ministerio de Fomento, Industria y Comercio. (2022). Plan Nacional de Producción, Consumo y Comercio 2022-2023. <https://www.mific.gob.ni/Inicio/%C3%81rea-de-Prensa/Notas-de-Prensa>.
- Murashige, T. (1974). "Plant propagation through tissue cultures." *Annual Review of Plant Physiology*, 25,135-166. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.25.060174.001031>
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays witch tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*,15, 473-497.
- Oliveira, L. S., Dias, P. C., & Brondani, G. E. (2013). Micropropagação de espécies florestais brasileiras. *Pesquisa Florestal Brasileira*, 33(76), 439–453. <https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.76.481>
- Orellana, P. (1998a). Propagación vía organogénesis. En: J. N Pérez Ponce (Ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología*. (pp. 151-178). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas.
- Orellana, P. (1998b). Introducción a la propagación masiva. En J. N Pérez Ponce (Ed.). *Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología* (pp.83-95), Instituto de Biotecnología de las plantas, Universidad Central de Las Villas.
- Orellana, P. (1995). *Perfeccionamiento de la tecnología para la micropropagación in vitro de plátanos y bananos (Musa spp)* [Tesis de doctorado] Universidad Central de las Villas.

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2006). *Base de Datos Agrícolas: FAOSTAT*. Recuperado el 17 de agosto de 2023 de <http://faostat.fao.org/site/343/DesktopDefault.aspx?PageID=343>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura & Organismo Internacional de Energía Atómica. (2004). Low cost options for tissue culture technology in developing countries Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26–30 August 2002 February 2004
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2000). Anuario de la producción. Vol. 54
- Perea, M., González, T., Campos, H., Guillot, G., y Cogua, J. (2009). *Cultivo de Tejidos Vegetales In vitro*: manual de prácticas de laboratorio. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79882>
- Pérez-Alonso, N., Capote, A., Pérez, A., Gómez, L. y Jiménez, E. (2015). Establecimiento y multiplicación *in vitro* de brotes de *Aloe vera* L. *Bioteología Vegetal*, 15(2), 85-95. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/14/494>
- Pérez, J., Jiménez, N. y Agramonte, D. (1998). Aumento de la eficiencia de la propagación masiva: En J. Pérez (Ed.), *Propagación y mejora genética de las plantas por biotecnología*. (pp.179-190).
- Posada-Pérez, L., Gómez, R., Reyes, M. y Álvarez, L. (2003). Empleo de los Sistemas de Inmersión Temporal (RITA) en la propagación de plantas vía organogénesis en caña de azúcar y bananos. *Bioteología Vegetal*, 3(1), 3-8. <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/198/html>
- Quintanilla Moreno, K. M. (2015). Micropropagación de plátano enano (*Musa* spp) utilizando manos de flores masculinas inmaduras con diferentes concentraciones de desinfectantes y reguladores de crecimiento. *Producción Agropecuaria Y Desarrollo Sostenible*, 3, 51–59. <https://doi.org/10.5377/payds.v3i0.3971>
- Rappacciolli McGregor, S.A. (2021). *Bioestimulantes*. <https://www.ramac.com.ni/producto/protifert-lmw/>
- Sandoval Fernández, J. A. (2001). *Bioteología aplicada para la micropropagación de banano y plátano (musa AAA, AAB)*. Zapote, Costa Rica: Corporación Bananera Nacional
- Sandoval, J. (1989). Anatomía y morfología de la planta de banano (*Musa* AAA). *CORBANA*, 24(51), 43-59.
- Servicio Nacional de Aprendizaje., Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria y Proyectos Nacionales de Transferencias de Tecnologías Agropecuarias. (1997). Primer informe del proyecto de multiplicación “*In-vitro* de plátano”. <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/4196/1/Multiplicaci%C3%B3n%20in-vitro%20de%20platan.pdf>
- Sharry, S., Adema, M. y Abedini, W. (2015). *Plantas de probeta: Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro*. Editorial de la UNLP. <https://libros.unlp.edu.ar/index.php/unlp/catalog/book/407>

- van Huylenbroeck, J., Piqueras, A. & Debergh, P. (1998). Photosynthesis and carbon metabolism in leaves formed prior and during *ex vitro* acclimatization of micropropagated plants. *Plant Physiology*, 134, 21-30.
- Vuylsteke, D. (1989). Shoot-tip culture for the propagation, conservation and exchange of Musa germplasm: Practical manuals for handling crop germplasm *in vitro* 2. International Board for Plant Genetic Resources. <https://hdl.handle.net/10568/98744>
- Vuylsteke, D. & Langhe, E. (1985). Feasibility of *in vitro* propagation of bananas and plantains. *Tropical Agriculture*, 62(4), 323-328.