



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
PROGRAMA RECURSOS GENÉTICOS NICARAGÜENSES**

TRABAJO DE DIPLOMA

TÍTULO:

**MEJORAMIENTO DE LA EFICIENCIA DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* DE
PLÁTANO (Musa AAB cv. Enano).**

AUTORES:

**Br. LUIS ALBERTO CALDERA CALDERA
Br. JUAN FRANCISCO LÓPEZ RUIZ**

ASESOR:

Ing. Agr. MARBELL AGUILAR MARADIAGA

MANAGUA, NOVIEMBRE 2002

AGRADECIMIENTO

A Dios que nos dió fuerza y voluntad para culminar nuestros estudios universitarios.

A cada uno de los maestros (as) que contribuyeron a nuestra formación intelectual, desde nuestros primeros grados hasta los que participaron en nuestros estudios universitarios; de manera especial al asesor Ing. Agr. Marbell Aguilar Maradiaga, Vuestros más sincero agradecimiento no solo por haber sido el maestro sino también el amigo.

Al equipo de laboratorio de cultivo de tejido, en especial a la señora Esmelda Bobadilla.

Al Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN) por facilitarnos los materiales y equipos necesarios, para la realización de nuestros estudios.

Al Ing. Agr. Álvaro Benavides González por brindarnos su ayuda incondicional en la realización de los análisis estadísticos.

Al Ing. Agr. Msc Guillermo Reyes Castro, por su ayuda incondicional y confianza, en realizar la revisión del escrito de tesis y habernos concedido su oficina para efectuar la etapa de escritorio.

Al Ing. Agr. José Dolores Cisnes, por su valioso sugerencia y recomendaciones al estudio.

Con el ánimo de no ofender a esas personas sin mencionar nombres de los que ofrecieron su desinteresada ayuda, preferimos abrazarlos a todos en un simple gesto de profundo agradecimiento, a todos ellos muchas gracias.

DEDICATORIA

A mis padres Julio Santiago López Velásquez y Odiliz del Carmen Ruíz Téllez, como un pequeño reconocimiento a su amor, paciencia, sacrificio y esperanza; la semilla que sembraron a germinado en forma de esfuerzo, esmero y superación personal.

A mis hermanas Marisela Antonia y Johana del Carmen López Ruíz, que han sido un apoyo incondicional hacia mi persona.

Al único abuelo que me queda: Pío Antonio Ruíz Tórrez, como un apoyo más en mi vida.

A mi tía María Natalia López Velásquez que en todo momento que la necesité estuvo presente.

Juan Francisco López Ruíz

DEDICATORIA

De manera muy especial dedico este trabajo a mis padres por haberme apoyado incondicionalmente a lo largo de toda mi vida; por haberme dado un buen ejemplo, por haberme apoyado en mi formación profesional; muy especialmente a mi madre por ser la persona más importante en mi vida y con mucho amor le dedico este trabajo.

A mi hermano Trinidad Bismarck Caldera, por haber sido un gran ejemplo digno de seguir, porque desde muy temprana edad dedicó gran parte de su tiempo a cuidarme y explicarme mis clases; se puede decir que invirtió su tiempo en mi persona, también le dedico este trabajo porque un día le prometí culminar con mi carrera y hoy puede estar seguro que todo ese sacrificio no fue en vano y con orgullo puedo decir hoy que he cumplido. Gracias por ser el hermano que nunca voy a olvidar y se que algún día volveremos a estar juntos.

A mi abuelita por su sacrificio, por haber tenido la dicha de llevarme por primera vez a clase y hoy de verme culminar mi carrera.

A mi familia en general (primos, tíos y parientes) porque de una u otra manera juegan un papel importante en mi vida.

Luis Alberto Caldera Caldera

Así como la lluvia y la nieve
bajan del cielo,
y no vuelven allá, sino que
empapan la tierra,
la fecundan y la hacen germinar,
y producen la semilla para
sembrar
y el pan para comer,
así también la palabra que sale
de mis labios
no vuelve a mí sin producir
efecto,
sino que hace lo que yo quiero
y cumple la orden que le doy.

INDICE GENERAL

Contenido	Página
INDICE GENERAL	i
INDICE DE TABLAS	iii
INDICE DE FIGURAS	iv
INDICE DE FOTOS	v
INDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	3
2.1 Materiales y equipos	3
2.2 Localización del experimento	4
2.3 Esterilización de materiales y equipos	4
2.4 Fase de establecimiento	4
2.4.1 Selección del material vegetativo	4
2.4.2 Preparación del material vegetativo	4
2.4.3 Desinfección del material vegetativo	5
2.4.3.1 Desinfección de los tejidos	5
2.4.4 Siembra del material vegetativo	5
2.4.5 Medios de cultivo en la fase de establecimiento	6
2.4.6 Análisis de los datos	6
2.4.7 Variables evaluadas	7
2.5 Fase de multiplicación	7
2.5.1 Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de brotes axilares	8
2.5.2 Diseño y análisis estadístico	8
2.5.3 - Efecto del tipo de frasco y el número de explante por frasco en la fase de multiplicación	9

2.5.4	Diseño y análisis estadístico	9
2.5.5	Variables evaluadas	9
2.6	Fase de enraizamiento	10
2.6.1	Medios de cultivo en la fase de enraizamiento	10
2.6.2	Diseño y análisis estadístico	11
2.6.3	Variables evaluadas	12
2.7	Aclimatación de las vitroplantas	12
2.7.1	Diseño y análisis experimental	12
2.7.2	Variables evaluadas	13
III	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
3.1	Fase de establecimiento	14
3.1.1	Grado de fenolización en el establecimiento de los ápices	14
3.1.2	Diferenciación de ápices	15
3.2	Fase de multiplicación	17
3.2.1	Subcultivos	17
3.2.2	Consistencia en números de subcultivos	20
3.2.3	Tipo de frasco y número de plantas por frasco	22
3.3	Fase de enraizamiento	26
3.4	Fase de aclimatación	28
IV.	CONCLUSIONES	31
V.	RECOMENDACIONES	32
VI.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	33
VII	ANEXOS	36

INDICE DE TABLAS

<u>Tabla</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1	Materiales y equipos	3
2	Variantes del medios de cultivos utilizadas en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de ápices caulinares de Plátano cv. Enano	6
3	Variantes de cultivo MS en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de Plátano cv. Enano.	8
4	Capacidad de frascos y número de 3, 4, 5 y 6 plantas por frasco utilizados en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de Plátano cv. Enano.	9
5	Variantes de medios utilizados en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de Plátano cv. Enano.	11
6	Porcentaje de fenolización y crecimiento en la fase de establecimiento de ápices de Plátano cv. Enano a las cuatro semanas de establecidos en el medio de cultivo M.S suplementado con diferentes niveles de AIA y BAP.	15
7	Comportamiento en el crecimiento de ápices de Plátano c v. Enano a las 8 semanas de establecidas en el medio de cultivo M.S suplementado con niveles combinados de AIA y BAP.	16
12	Efecto de doce (12) variantes de medio de cultivo en la aclimatación de vitroplantas de Plátano cv. Enano a las cuatro (4) semanas.	29

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1	Efecto de seis variantes de medio de cultivo durante cinco subcultivo (s) en la variable altura de planta en la fase de multiplicación.	19
2	Efecto de seis variantes de medio de cultivo durante cinco subcultivo (s) en la variable número de brotes en la fase de multiplicación.	19
3	Efecto de seis variantes de medio de cultivo y dos consistencias en la variable altura de planta, en la fase de multiplicación.	21
4	Efecto de seis variantes de medio de cultivo y dos consistencias en la variable número de brotes, en la fase de multiplicación.	21
5	Efecto de tres tipos de frasco y diferentes número de plantas por frasco en las variable altura de planta, en la fase de multiplicación.	23
6	Efecto de tres tipos de frasco y diferentes número de plantas por frasco en las variable número de brotes, en la fase de multiplicación.	24
7	Efecto de doce variantes de medios de cultivo en la variables altura de planta, en la fase de enraizamiento.	26
8	Efecto de doce variantes de medio de cultivo en el enraizamiento de plátano cv. Enano a las tres semanas.	27

INDICE DE FOTOS

<u>Fotografía</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
1	a) Plantas jóvenes de cv. Plátano Enano utilizados en la fase de establecimiento b) Tamaño promedio de los ápices en la fase de establecimiento.	5
2	Plántulas de Plátano cv. Enano en la fase de establecimiento en 5 variantes de medio de cultivo a las ocho semanas.	17
3	Tipos de frascos utilizados en la fase de multiplicación de 100, 200 y 300 ml (izquierda a derecha).	25
4	Representación de plántulas de Plátano cv. Enano en doce variantes de medio MS suplementado con AIA y sacarosa en la fase de (* = AIA; **= sacarosa).	27
5	Efecto de la concentración de sacarosa en el la adaptación de plántulas en la fase de aclimatación; plantas con 30, 40 50 y 60 g/l de sacarosa (izquierda a derecha).	30

ÍNDICE DE ANEXOS

<u>Tabla</u>	<u>Contenido</u>	<u>Página</u>
8	Resultado de la interacción entre los tratamientos medios de cultivo y subcultivos en las variables altura de planta, número de hojas y número de brotes en la fase de multiplicación.	37
9	Resultados de la interacción entre los tratamientos, medios de cultivo y consistencia en las variables altura de planta, número de hojas y número de brotes en la fase de multiplicación.	38
10	Efecto de interacción de los tratamientos tipos de frasco y número de plantas por frasco en las variables altura de planta, número de hojas y número de brotes en la fase de multiplicación.	39
11	Efecto de doce (12) variantes de medio de cultivo en el enraizamiento de plántulas de Plátano cv Enano, a las cuatro (4) semanas.	40
Foto N ^o 6	Plántulas del Plátano cv. Eenano en la fase de multiplicación en 6 variantes de medio MS suplementado con una dosis AIA y 5 dosis diferentes de BAP en dos consistencia (líquida y semisólida) y un testigo.	41
Foto N ^o 7	Plántulas antes de ser llevadas al campo, bandeja y bolsa (izquierda a derecha).	41

RESUMEN

En el período comprendido de noviembre del año 2001 a julio del año 2002, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional Agraria (UNA) se realizó el estudio de la propagación *in vitro* en el cultivo de Plátano, (AAB) cv Enano. A las cuatro semanas del establecimiento se evaluó el porcentaje de fenolización de los ápices, en el medio de cultivo que contenía solamente las sales Murashige y Skoog el 100% de los tejidos produjo el más bajo nivel de fenoles. A las ocho semanas se evaluó el efecto de las variantes de medios de cultivo en la formación de plantas. Cuando se agregó al medio de cultivo 0.3 mg/l de Ácido indol acético y 1 mg/l de Bencil amino purina se registró 53.3% de plantas formadas y el 26% de estas emitieron brotes axilares. En la fase de multiplicación los experimentos se evaluaron a las tres semanas determinándose los mejores tratamientos a través del análisis de Varianza y separación de Medias de Tukey ($\alpha = 0.05$). Los mejores coeficientes de brotación se presentaron en los medios suplidos con 4 y 5 mg/l de Bencil amino purina, con valores respectivos de 4.2 y 4.46 brotes por planta. La consistencia semisólida del medio de cultivo superó al medio líquido en las variables altura de planta y número de brotes. La mejor combinación tipo de frasco y número de planta, fue con la siembra de cinco brotes en frascos de 200 ml con resultados de brotación de 2.08 y 2.05 respectivamente. En el enraizamiento se comprobó que concentraciones de sacarosa entre 30 g/l y 60 g/l combinadas con 1 y 2 mg/l de Ácido Indol Acético favorecen el incremento de las variables evaluadas. La sobrevivencia de las vitroplantas en condiciones ambientales fue del 100% cuando estas provinieron de medios de cultivos con niveles de sacarosa de 50 y 60 g/l combinadas con 1 y 2 mg/l de Ácido Indol Acético.

I- Introducción

El plátano (*Musa spp*), fue una de las primeras frutas que cultivaron los agricultores primitivos, (Soto 1985). Las musáceas son nativas del sur-este asiático. El género *Musa* está constituido por cuatro secciones o series: Australiamusa, Callimusa, Rhodochlamys y Eumusa (Simmonds, 1962). La sección Eumusa es la de mayor interés económico que incluye la mayor parte de los cultivares conocidos de banano (AAA) y plátano (AAB, ABB), que son producto de la hibridación entre dos especies silvestres: *Musa acuminata colla* y *Musa balbisiana colla* (AAB, ABB), (Simmonds y Shepherd 1955).

La producción anual de los bananos y plátanos se estima alrededor de 88 millones de toneladas (FAO 1999). Esto lo coloca como uno de los alimentos de mayor producción mundial después del arroz, maíz y trigo (INIBAP, 1997).

El plátano tiene gran importancia a nivel mundial y nacional no solo porque forma parte de la dieta del hombre, sino también porque las áreas plataneras son fuentes de empleo permanente y de generación de divisas. En Nicaragua, los productores plataneros extraen de la plantación en producción material vegetativo que generalmente son los conocidos como "hijos de espada" o "cola de burro". Entre los inconvenientes de esta práctica están el anclaje de la planta madre, se produce competencia por nutrientes entre la planta madre y sus vástagos; además de la inversión en tiempo y mano de obra en la extracción del material vegetativo y del alto riesgo de diseminación de plagas y enfermedades, (Aguilar y Reyes, 1992).

Los cultivares de plátano (AAB) que más se cultivan en Nicaragua, son el Plátano Cuerno y el Plátano Enano, con buena aceptación en el mercado nacional; sin embargo en los últimos años el uso de semilla de mala calidad ha provocado una reducción drástica en estos cultivares debido al ataque de plagas como el picudo (*Cosmopolites sordiduss*), nemátodos (*Rodophulus similis*), etc. como también por enfermedades como la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet); que causan considerables pérdidas a los agricultores y en divisas para el país, (Alemán et al., 1994).

En los últimos años la técnica de cultivos de tejidos a través de la micropropagación se ha convertido en una alternativa para la propagación y saneamiento de especies de reproducción vegetativa.

La micropropagación tiene ventajas en comparación con los métodos tradicionales de reproducción de semilla garantizar material de mayor calidad por el saneamiento de plagas y enfermedades de origen bacteriano y fungosas, además se obtiene un mayor volumen de plantas que se pueden producir en corto período y en áreas reducidas, uniformidad de las plantas producidas, entre otras ventajas, (Aguilar y Reyes, 1992).

Para facilitar el éxito de la micropropagación del cultivar plátano Enano se realizaron diferentes experimentos para definir los mejores tratamientos que garanticen un mejor manejo en las diferentes fases *in vitro*.

Con la realización del presente estudio nos proponemos cumplir con los siguientes objetivos:

General

Mejorar la eficiencia de la metodología de micropropagación de Plátano (*Musa* spp. cv. Enano AAB).

Específicos

- 1- Definir las mejores concentraciones de AIA y 6-BAP en las fases de establecimiento y multiplicación *in vitro* de ápices caulinares.
- 2- Evaluar el comportamiento del cultivar de Plátano Enano en las variantes: números de subcultivos, números de plantas por frasco y tipos de frasco en el proceso de micropropagación.
- 3- Definir la mejor variante de medio de cultivo en la fase de enraizamiento.
- 4- Estudiar el comportamiento de las vitroplantas del Plátano Enano en la fase de aclimatación.

II- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1- Materiales y equipos

En la Tabla 1 se detallan los materiales y equipos que fueron utilizados en el estudio tanto en las fase de campo y laboratorio.

Tabla 1. Materiales y equipos

Agua destilada	Escalpelos y cuchillas
Agua desionizada	Gradillas
Ácido clorhídrico (HCl)	Hidróxido de potasio (KOH)
Agitadores Magnéticos	Frascos de plástico y vidrio
Alcohol	Horno*
Algodón	Machetes
Autoclave*	Marcadores
Bandeja de aclimatación (60 orificios)	Mecheros Bunsen
Bandeja de laboratorio	Parafina (cintas)
Balanza analítica*	Papel de aluminio
Bolsas plásticas	Pinzas
Beakers	Pipetas, regla milimetrada
Papel craft	Platos petri
Calentadores electromagnéticos*	Potenciómetro*
Cámara de flujo laminar*	Reguladores de crecimiento AIA y BAP
Cámara fotográfica	Sacarosa; Phytigel
Cinta adhesiva	Reactivos varios
Cuchillos	Tubos de ensayo
Destilador de agua*	Humus
Desionizador de agua*	Frascos de plástico y vidrio

* Equipos

2.2- Localización del experimento

El presente estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos del Programa Recursos Genéticos Nicaragüenses (REGEN), ubicado en el km 12 ½ Carretera Norte, Managua, en el periodo comprendido entre noviembre del 2001 a julio del 2002.

2.3- Esterilización de materiales y equipos

En la limpieza de la cristalería se utilizó Hipoclorito de Sodio NaClO₃ en concentraciones del 1% durante 24 horas, se realizó un enjuague con agua y detergente, posteriormente se escurrió durante 2 horas para evitar que quedaran residuos de agua.

Previo a la siembra de los tejidos *in vitro*, los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 120 °C durante 20 minutos; las platos petri, pinzas y bisturíes se esterilizaron en el horno a temperaturas de 170 °C durante 2 horas. También se desinfectó la cámara de flujo laminar inicialmente con alcohol al 90% y luego se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos.

2.4- Fase de establecimiento

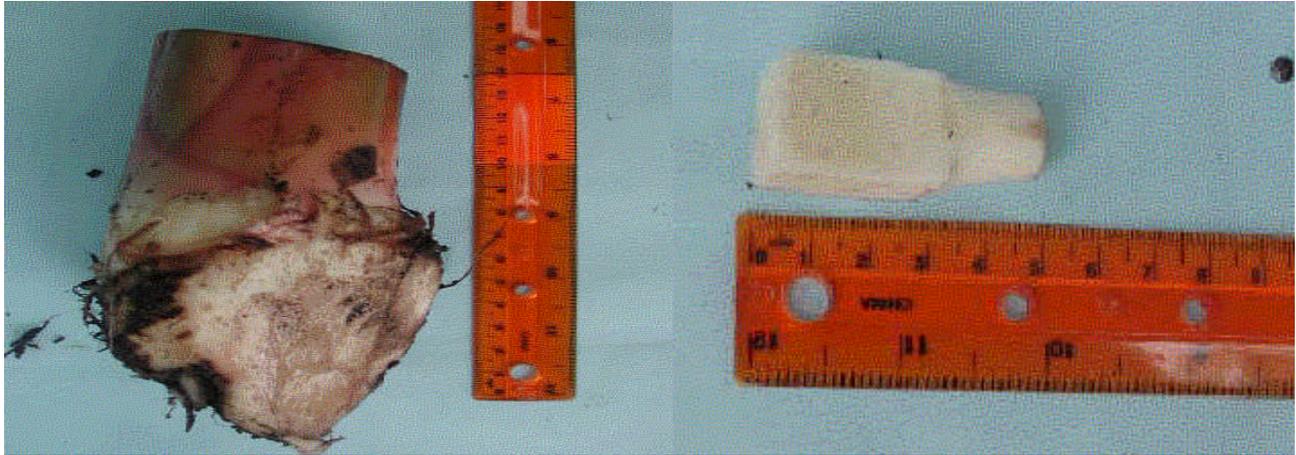
2.4.1- Selección del material vegetativo

El material vegetativo utilizado fue obtenido de áreas de siembra o de productores del departamento y municipio de Masaya, se seleccionaron renuevos conocidos como "hijos de espada" de tamaño de 40 a 50 cm de altura, que además presentaban un buen estado morfológico y fisiológico.

2.4.2- Preparación del material vegetativo

Utilizando machetes se realizaron cortes en el cormo y en el pseudotallo, posteriormente se redujeron los tejidos hasta dejar el explante con una medida de 4 a 5 cm de longitud por 2 a 3 cm de ancho aproximadamente; después se sumergieron durante 5 minutos en agua con detergente para desprender los

residuos de polvo y otras impurezas, se hacen enjuagues sucesivos hasta lograr una limpieza completamente de los tejidos, asimismo para reducir la fenolización y evitar la deshidratación de los explantes. (Foto 1)



a

b

Foto 1. a) Plantas jóvenes de cv. Plátano Enano utilizados en la fase de establecimiento
b) Tamaño promedio de los ápices en la fase de establecimiento

2.4.3- Desinfección del material vegetativo

2.4.3.1- Desinfección de los tejidos

Se practicó una reducción a los explantes hasta obtener un tamaño aproximado de 4 cm, luego se lavaron con detergente y agua limpia, realizándose la primera desinfección en cloro comercial al 2% durante 5 minutos. La segunda desinfección se realizó en la cámara de flujo laminar en el cuarto de siembra, sumergiendo los explantes en cloro comercial al 2% durante 5 minutos, luego se efectuaron tres enjuagues sucesivos con agua estéril, finalmente sobre platos petri previamente esterilizados se efectuó la reducción de los explantes hasta aproximadamente 0.5 cm de tamaño.

2.4.4- Siembra del material Vegetativo

Los explantes se sembraron individualmente en tubos de ensayo con dimensiones de 14.7 cm de longitud y 2.4 cm de diámetro, con tapones de hule, adicionándose a cada tubo 10 ml de medio de cultivo. Una vez concluida la inoculación los ápices, fueron trasladados al cuarto de crecimiento con condiciones de 27 °C,

16 hrs luz y 8 hrs de oscuridad, 2000 lux de intensidad; 3 semanas después se efectuó una limpieza para eliminar la acumulación de fenoles en los explantes facilitando de esta forma la brotación de la yema.

2.4.5- Medios de cultivo en la fase de establecimiento

Diferentes autores reportan el medio de Murashige & Skoog (1962), como el más ampliamente utilizado para el cultivo de meristemas y ápices, reportándose su empleo en la mayoría de las especies propagadas *in vitro*. Se realizaron dos estudios durante esta fase, el primero consistió en determinar el porcentaje de fenolización de los ápices a las tres semanas de establecidos en cinco variantes de medios de cultivo y en el segundo estudio se evaluó el porcentaje de plantas formadas a partir de los ápices establecidos a las ocho semanas en las mismas variantes de medios de cultivo. (Tabla 2).

Tabla 2. Variantes de los medios de cultivos utilizadas en la fase de establecimiento *in vitro* de ápices caulinares de Plátano cv. Enano .

Variantes del medio (MS, 1962)	* AIA mg/l	** BAP mg/l
1	0	0
2	0.15	1
3	0.3	1
4	0.15	2
5	0.3	2

• =Ácido indolacético, ** = Bencil amino purina, MS= Murashige y Skoog.

2.4.6- Análisis de los datos

Para el análisis de los datos se realizó una tabla de porcentajes. En esta fase se evaluaron cinco variantes constituyendo cada una de ellas una réplica conformada por 15 explantes.

2.4.7- Variables evaluadas

Se asignaron las siguientes categorías en Fenolización: (%)

- A- Sin fenoles en tejidos y medios de cultivo
- B- Tejidos con fenoles y medios de cultivo sin fenoles
- C- Tejidos con fenoles y medios de cultivo parcialmente fenolizados
- D- Tejidos y medios de cultivos altamente fenolizados

Las evaluaciones se realizaron 21 días después que los explantes fueron inoculados en la superficie del medio. Las variables evaluadas fueron las siguientes:

Estado de crecimiento en (%).

- 1- Sin crecimiento: no presentan coloración verde
- 2- En crecimiento: presentan coloración verde

Variables evaluadas a las ocho semanas:

- 1- Plantas no formadas.
- 2- Plantas formadas.
- 3- Plantas formadas con brotes.

2.5- Fase de multiplicación

Se efectuaron dos experimentos. En el primero se estudiaron el comportamiento de las vitroplantas en seis variantes de medio de cultivo suplidos con AIA y BAP durante cinco subcultivos y el efecto de la consistencia líquida y semisólida de los medios de cultivo. En el segundo experimento se estudió el efecto en la tasa de multiplicación de en tres tipos de frascos con capacidad de 100, 200 y 300 ml, y del número de plantas por frasco (3, 4, 5 y 6) en el medio de cultivo MS suplementado con 0.3 mg/l AIA y 5 mg/l BAP.

2.5.1- Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de brotes axilares

Se estudió el efecto sobre las vitroplantas en cinco concentraciones de BAP y una concentración de AIA en dos consistencias de medios de cultivo líquida y semisólida, en cinco subcultivos sucesivos (Tabla 3). Para este estudio se utilizaron frascos de 200 ml; se agregaron 30 ml de medios de cultivo cuando la consistencia era semisólida y 15 ml cuando la consistencia era líquida. Los brotes y plantas producidos en cada variante de medio de cultivo se estudiaron en la misma variante en el siguiente subcultivo.

Tabla 3. Variantes de cultivo MS en la fase de multiplicación *in vitro* de Plátano cv. Enano.

Variantes del medio (MS, 1962)	* AIA (mg/l)	** BAP
1	0	0
2	0.3	1
3	0.3	2
4	0.3	3
5	0.3	4
6	0.3	5

*=Ácido indolacético, ** = Bencil amino purina.

2.5.2- Diseño y análisis estadístico

Para este estudio se utilizaron 6 repeticiones por tratamiento (frascos) y cuatro plantas por frasco, cada frasco se consideró una réplica; las evaluaciones se realizaron a las tres semanas de establecido el experimento.

El experimento se estableció en un diseño de bloques completamente al azar (B.C.A), con arreglo trifactorial.

En el análisis estadístico se realizó un ANDEVA y separación de medias usando Tukey $\alpha = 0.05$. Los datos fueron procesados y analizados en el programa estadístico SAS.

2.5.3- Efecto del tipo de frasco y el número de explante por frasco en la fase de multiplicación

Se estudió el efecto en la fase de multiplicación de tres tipos de frascos y número de plantas por frasco (3, 4, 5 y 6) en un mismo medio de cultivo, (Tabla 4).

2.5.4- Diseño y análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño de bloques completamente al azar (BCA) con arreglo bifactorial con seis repeticiones por tratamiento de tipo de frasco y número de plantas por frasco. Se empleó el mismo análisis que en el primer experimento de multiplicación; la evaluación se realizó a las tres semanas de establecido.

Tabla 4. Capacidad de frascos y número de 3, 4 , 5 y 6 plantas por frasco utilizados en la fase de multiplicación *in vitro* de Plátano cv. Enano.

Variantes	Cantidad de medio de cultivo (ml)
Tipo de frasco capacidad (ml)	
100	15
200	30
300	45

2.5.5- Variables evaluadas

En ambos experimentos las variables que se evaluaron fueron:

- a- Altura de planta (cm): Para tal efecto se utilizó una regla graduada en centímetros a partir de la base del tallo hasta el inicio de la primera hoja.
- b- Número de hojas: Se contabilizó el número de hojas producidas por los brotes a las tres semanas de permanecer en el medio de cultivo.

- c- Número de brotes por planta: Se tomaron datos del número de nuevos brotes que surgen de cada planta a las tres semanas de permanecer en el medio de cultivo.

2.6- Fase de enraizamiento

La importancia de la fase de enraizamiento está en lograr que las vitroplantas próximas a ser adaptadas a condiciones ambientales, tengan suficientes raíces que las preparen a las nuevas condiciones, donde a diferencia del medio de cultivo, las plantas tienen que absorber el agua y los nutrientes del sustrato.

Este estudio se inició con la selección de plantas obtenidas en la fase de multiplicación, con 2 – 3 hojas y 3 cm de altura; posteriormente fueron sembradas en frascos de vidrio con capacidad de 200 ml. Se sembraron 4 plantas por frasco, para determinar la respuesta al enraizamiento en cada una de las variantes de medio de cultivo.

2.6.1- Medios de cultivo en la fase de enraizamiento

Se estudió la respuesta de las variables altura de la planta (cm), número de hojas, número de brotes, plantas enraizadas y longitud de raíces en doce variantes de medio de cultivo, a las cuatro semanas (Tabla 5).

Tabla 5. Variantes de medios utilizados en la fase de enraizamiento *in vitro* de Plátano cv. Enano.

Variantes del medio (MS, 1962)	*AIA (mg/l)	Sacarosa (g/l)
1	0	0
2	0	30
3	1	0
4	2	0
5	1	30
6	2	30
7	1	40
8	2	40
9	1	50
10	2	50
11	1	60
12	2	60

*=Ácido indol acético, MS= Murashige y Skoog.

2.6.2- Diseño y análisis estadístico

El número de réplicas utilizadas en cada tratamiento fue de seis por tratamiento, con un número de 4 plantas por frasco.

El experimento se estableció en un diseño de bloque completamente al azar (BCA), en arreglo unifactorial. Se realizó ANDEVA y para definir el mejor tratamiento la prueba de medias de Tukey $\alpha = 0.05$. para las variables altura de la planta, número de hojas y número de brotes; y en el caso de los datos no paramétricos sobrevivencia y número de plantas con raíces, los resultados se determinaron en porcentaje.

2.6.3- Variables evaluadas

La evaluación se realizó a las 4 semanas de inicio del ensayo.

- 1- Supervivencia
- 2- Número de plantas con raíces
- 3- Altura de las plantas
- 4- Número de hojas
- 5- Número de brotes

2.7- Aclimatación de las vitroplantas

El objetivo principal de esta fase es lograr la adaptación de las vitroplantas al medio ambiente externo, con altas tasas de supervivencia en corto tiempo y a bajos costos. Esta fase es una de las más importante en la micropropagación. Se emplearon vitroplantas provenientes de la fase de enraizamiento. En el experimento se evaluaron 15 vitroplantas por cada medio de enraizamiento las que fueron trasladadas a condiciones de sombreadero y sembradas en un sustrato de humus de lombrices.

Las vitroplantas se establecieron en bandejas plásticas de 60 orificios de $2 \frac{1}{8}$ por $2 \frac{7}{8}$, Posteriormente a la siembra, las bandejas fueron trasladadas al sombreadero donde se les suministró un riego diario, permaneciendo en estas condiciones durante cuatro (4) semanas.

2.7.1- Diseño y análisis experimental

Para el procesamiento de los datos no paramétricos se elaboraron tablas de porcentaje para la variable supervivencia. Para las variables número de hojas y altura de la planta se utilizó un diseño de bloque completamente al azar (BCA), con arreglo unifactorial, evaluándose 15 plantas proveniente de cada variante de medio de la fase de enraizamiento. Los datos de las variables altura de planta y número de hojas se realizó el correspondiente análisis de ANDEVA y la prueba de medias de Tukey $\alpha = 0.05$.

2.7.2- Variables evaluadas

- 1- Porcentaje de sobrevivencia.
- 2- Número de hojas.
- 3- Altura de planta.

II- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1- Fase de establecimiento

3.1.1- Grado de fenolización en el establecimiento de los ápices

Las oxidaciones fenólicas pueden en ocasiones constituir un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemas y ápices, las cuales se manifiestan como un ennegrecimiento en los tejidos y puede extenderse a todo el medio de cultivo produciendo una seria afectación en el crecimiento del explante, al que puede provocar la muerte. Esto constituye en múltiples ocasiones una dificultad para el establecimiento de los cultivos *in vitro* (Pérez, 1998).

Se considera que la oxidación de los sustratos fenólicos que produce la enzima polifenoloxidasas, es la principal causa de coloración oscura de la fruta de banano durante el manejo, almacenamiento y procesamiento (Gooding, 2001).

Esta misma enzima afecta a los cultivos *in vitro* y se incrementa cuando los tejidos son cortados, durante la preparación del explante, facilitando que los compuestos fenólicos que están acumulados en grandes cantidades en las vacuolas se mezclan con el contenido de los plastidios y otros organelos donde están confinadas las polifenoloxidasas y aparece la coloración negra o marrón como consecuencia del proceso de oxidación (Jiménez, 1997).

En la fase de establecimiento, a las tres semanas se evaluó el grado de fenolización, observándose que los ápices segregaron fenoles en las cinco variantes de medio de cultivo. Los resultados reflejaron que en la variante de medio de cultivo sin reguladores de crecimiento (testigo) los tejidos segregaron fenoles pero no se difundieron en el medio de cultivo; mientras a las variantes que contenían combinaciones de AIA y BAP la producción de fenoles de los ápices se incrementó; estos resultados indican que el grado de fenolización se aumenta con la adición de sustancias reguladoras de crecimiento (Tabla 6).

Tabla 6 Porcentaje de fenolización y crecimiento en la fase de establecimiento de ápices de Plátano cv. Enano a las cuatro semanas de establecidos en el medio de cultivo M.S suplementado con diferentes niveles de AIA y BAP.

Concentración (mg/l)		Grado de fenolización (%)				Estado de crecimiento (%)	
AIA	BAP	A	B	C	D	Sin crecim	En crecim
0	0	0	100	0	0	100	0
0.15	1	0	57.9	42.1	0	60	40
0.30	1	0	78.94	15.78	5.26	46.66	53.34
0.15	2	0	84.22	15.78	0	60	40
0.30	2	0	78.94	21.05	0	66.66	33.33

George (1993) señala que con el corte en la superficie de muchos explantes se inicia un cambio de color. Los explantes o parte de ellos, frecuentemente continúan oscureciéndose una vez introducidos al frasco, donde pueden además exudar sustancias de coloración oscura dentro del medio y con frecuencia se inhibe el crecimiento de los tejidos que incluso pueden morir. Otros autores reportan que los daños que resultan de la producción de fenoles es usualmente más severa durante el estado inicial del cultivo y deja de ser un problema hasta que los explantes han comenzado a crecer. Lee (1998) demostró experimentalmente que las citoquininas tales como la N6 sustituto de la adenina incrementan el ennegrecimiento de los tejidos de banano, por lo tanto recomienda omitir esta citoquinina cuando se inicia el cultivo. Además del uso de sustancias antioxidantes, recomienda mantener los tejidos en la oscuridad o reducir la temperatura de incubación.

3.1.2- Diferenciación de ápices

Un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas a partir de meristemas, ápices o yemas. Este balance está determinado por las concentraciones endógenas de auxinas y citoquininas presentes en el explante las cuales dependen de la especie y del tipo de explante (Jiménez, 1997).

Un segundo estudio se realizó en la fase de establecimiento para determinar el efecto en la diferenciación de los ápices de plantas formadas de cinco variantes en medio de cultivo M.S a las ocho semanas del establecimiento de los ápices.

En el medio suplementado con 0.30 mg/l AIA y 1 mg/l BAP se incrementó el porcentaje de plantas formadas con el 53.34%, de las cuales el 26.66% emitieron brotes y el 46.66% no formaron plantas; en los medios suplementados con 0.15 y 0.30 mg/l AIA combinados con 2 mg/l BAP, se registró el menor porcentaje de plantas formadas con el 40 y 33.33% respectivamente; éstas variantes superaron a los otras en la formación de brotes axilares con porcentajes de 66.66 y 40% respectivamente. En la evaluación del estado de crecimiento de los ápices, no se observó crecimiento en el 100% de los tejidos inoculados en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento; en las otras variantes de medio de cultivo se presentaron diferentes porcentajes de ápices sin crecimiento y ápices en crecimiento (Tabla 7) (Foto 2).

Tabla 7. Comportamiento en el crecimiento de ápices de Plátano c v. Enano a las 8 semanas de establecidas en el medio de cultivo M.S suplementado con niveles combinados de AIA y BAP.

Concentración (mg/l)		Plantas no formadas %	Plantas formadas %	Plantas formadas con brotes %
AIA	BAP			
0	0	100	0	0
0.15	1	60	40	20
0.30	1	46.66	53.34	26.66
0.15	2	60	40	66.66
0.30	2	66.66	33.33	40



Foto 2. Plántulas de Plátano cv. Enano en la fase de establecimiento en 5 variantes de medio de cultivo a las ocho semanas.

El grado de oscurecimiento o inhibición del crecimiento de los tejidos está en dependencia del genotipo, resultando muy severos en géneros que naturalmente contienen altos niveles de taninos y otros hidroxifenoles como ocurre en plátano y banano (Jiménez, 1997).

3.2- Fase de multiplicación

3.2.1- Subcultivos

La fase de multiplicación es la más importante del proceso de micropropagación, en la que se debe garantizar la propagación de los brotes y la estabilidad genética de las plantas producidas (Jiménez *et al.*, 1998).

El balance de auxinas-citoquininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, con un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de proliferación aumentando la efectividad del método de micropropagación (Orellana, 1998). Sin embargo, es necesario tener cuidado en el manejo de los reguladores de crecimiento en esta fase, ya que con el empleo continuado de altas concentraciones de citoquinina en el medio de cultivo se puede inducir la formación de yemas adventicias, lo cual representa un inconveniente dentro del proceso de propagación (Agramonte, 1997).

En el medio de cultivo sin adiciones de AIA y BAP a partir del tercer subcultivo las plantas alcanzaron la mayor altura, sin presentarse diferencias estadísticas significativas con la mayoría de los tratamientos. Se observó que con suministros de 0.3 mg/l AIA y 3 mg/l BAP, la altura se redujo en cada subcultivo, mientras que el número de hojas experimentó esta misma tendencia a partir del segundo subcultivo, emitiendo una hoja en el quinto subcultivo, que resultó estadísticamente inferior a 23 de los 30 tratamientos (Figura 1 y 2).

Fue evidente que la emisión de brotes disminuyó en cada subcultivo en el medio de cultivo sin adición de AIA y BAP, mientras en los medios con 3, 4 y 5 mg/l BAP se indujeron los mayores promedios de brotación, con valores de 3.56, 4.19 y 4.41. Pérez *et al.*, (1998) señala la importancia del incremento del coeficiente de multiplicación durante la propagación *in vitro* de Plátano debido a que, cada unidad de aumento en este indicador disminuyen los costos en aproximadamente un 10%. El comportamiento de las tres variables evaluadas, reflejó que los mayores valores en altura de planta y número de hojas, no inducen a una mayor brotación de las vitroplantas; pero sí se demostró que la emisión de brotes está más relacionada con las concentraciones de BAP que se agregan al medio de cultivo, aunque también no se descarta el efecto que produce la procedencia del brote utilizado que puede ser una planta madre, de hijos o nietos, de acuerdo a lo reportado por Reyes (1995). La procedencia de los brotes ocasiona variaciones en el ahijamiento dentro de los subcultivos, las plantas que se originan de planta madre producen mayor número y desarrollo de las hojas, gran número de raíces y plantas altas; y las plantas provenientes de hijos, producen más brotes, pero son más cortos y con menor número de hojas y raíces (Rodríguez *et al.*, 1987).

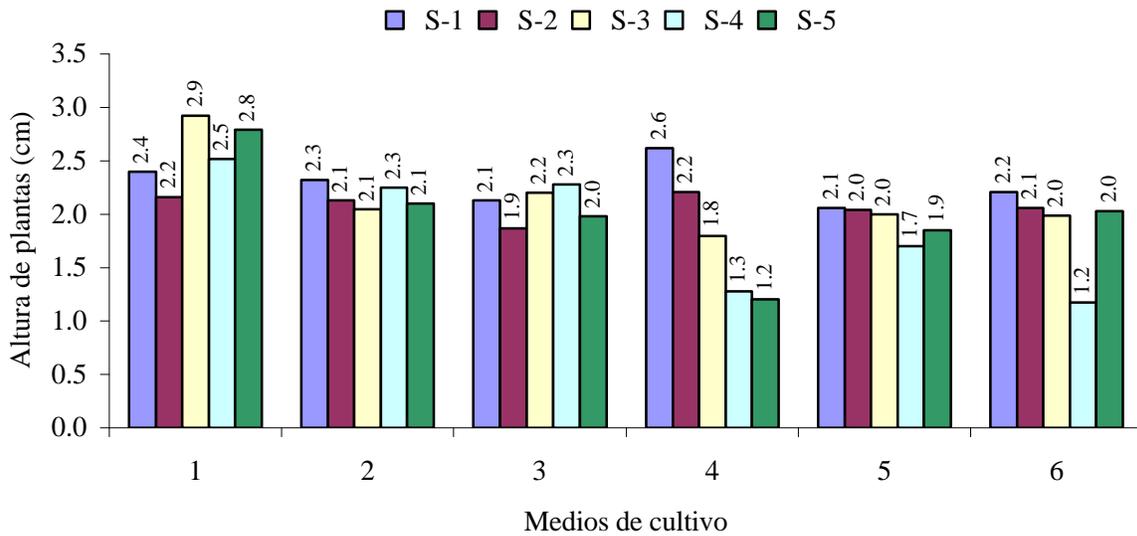


Figura 1. Efecto de seis variantes de medio de cultivo durante cinco subcultivo (s) en la variable altura de planta en la fase de multiplicación.

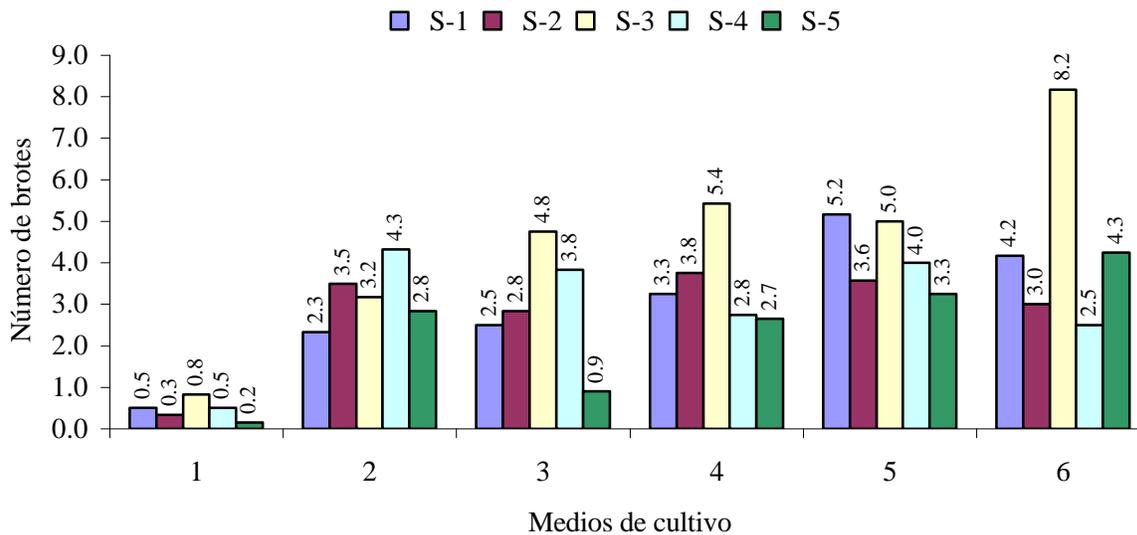


Figura 2. Efecto de seis variantes de medio de cultivo durante cinco subcultivo (s) en la variable número de brotes en la fase de multiplicación.

A medida que aumenta el número de subcultivos hay una tendencia al incremento del número de brotes por explante y se puede incrementar la formación de yemas adventicias. Además puede darse el fenómeno de un efecto de "habituación" de los tejidos en medio con citoquininas, este efecto ha sido descrito en varias

especies, y al parecer estos tejidos comienzan también a producir su propia citoquinina en estas condiciones, lo cual hace que haya una mayor estimulación de brotes axilares y adventicios (Agramonte,1997).

3.2.2- Consistencia en números de subcultivos

En los medios de cultivo sin adición de AIA y BAP de consistencia semisólida se obtuvo una altura de 2.80 cm que superó estadísticamente a los promedios alcanzados en los medios suplementados con 2, 3, 4 y 5 mg/l BAP y a las plantas que crecieron en medios de cultivo de consistencia líquida que contenían 5 mg/l de BAP se registró el menor número de hojas por plantas aunque estadísticamente sólo fueron superados estos valores cuando las plantas crecieron en medios suplementados con 1, 2 y 4 mg/l BAP en consistencia líquida y únicamente al medio que se le adicionó 1 mg/l BAP. El número de brotes fue mejor estadísticamente en el medio de cultivo con 5 mg/l y consistencia semisólida con 5.80 brotes promedio por planta, que superó a los resultados obtenidos en todas las variantes de medio de cultivo de consistencia líquida y con 0 y 1 mg/l BAP. Estos resultados indican que en el número de brotes se ve más influenciado por la consistencia del medio de cultivo y por las dosis de BAP que se adicionen a los medios, más que por efecto que producen las variables altura y número de hojas por planta que presentan un comportamiento inverso, a mayor número de brotes menor altura de planta y viceversa. En las figuras (3 y 4) se observan las tendencias de las variables altura de planta y número de brotes en la consistencia líquida y semisólida y sus variantes de medio de cultivo.

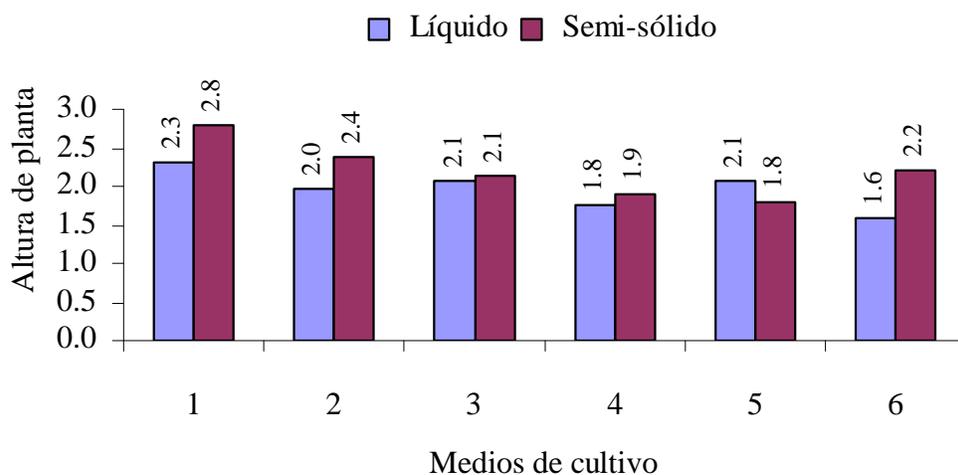


Figura 3. Efecto de seis variantes de medio de cultivo y dos consistencias en la variable altura de planta, en la fase de multiplicación.

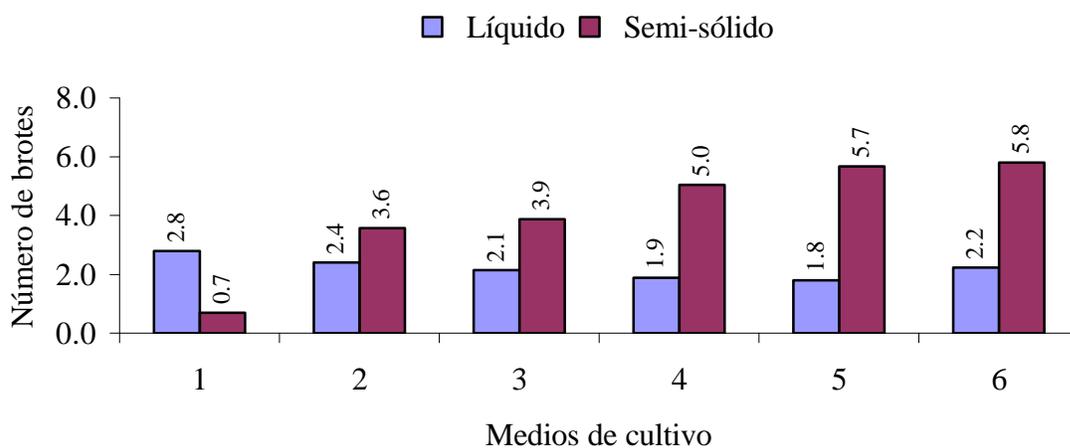


Figura 4. Efecto de seis variantes de medio de cultivo y dos consistencias en la variable número de brotes, en la fase de multiplicación.

El medio líquido tiene la limitante de que no todas las especies responden igual al crecimiento de éste, ni todos los genotipos dentro de una misma especie se comportan de igual manera (Agramonte, 1997). Orellana (1998) observó en plátano y banano una tendencia a la reducción del coeficiente de multiplicación a medida que se dan subcultivos continuos en medio líquido. Este resultado en los medios líquidos es completamente distinto a lo observado en los medios en estado semisólido, donde existe un incremento a medida que

aumenta el número de subcultivos; la explicación de este fenómeno radica en un problema físico: la menor oxigenación de los tejidos, con lo cual se reduce o elimina la formación de brotes de yemas axilares en los explantes que se hace más evidente en cada subcultivo (Agramonte,1997).

Orellana (1998) reportado por (Águila *et al.*, 2002), señala que existen diferencias en el crecimiento de los tejidos en dependencia del estado físico del medio de cultivo; el manejo no es el mismo cuando se utilizan medioa de cultivo semisólidos y líquidos.

3.2.3- Tipo de frasco y número de plantas por frasco

Una baja densidad (planta por frasco) ocasiona pérdidas de espacio y medio de cultivo, subutilización de recipientes, demanda mayor capacidad de esterilización con la consiguiente elevación de los costos en materiales, energía y mano de obra. Con una densidad demasiado alta ocasiona crecimiento limitado de los propágulos e insuficiente proliferación, subcultivos más frecuentes y poco desarrollo de los brotes. Diferentes autores reportados por Lee (1998) destacan que cuando se inoculan una mayor densidad de explantes en un solo frasco se produce mayor cantidad de brotes y raíces, debido posiblemente a que los explantes difunden sustancias como las auxinas y citoquininas. Chun *et al.*, (1986) observaron en *populos* que cuando solo se inoculaba un explante por frasco la tasa de multiplicación fue de un brote, mientras que con 2 o 3 explantes se produce un gran número de brotes.

Se determinó que el comportamiento de la altura de la planta está en dependencia del número de plantas por frasco y del tipo de frasco. En el análisis de diferencias de medias se observó que las menores alturas se alcanzan cuando se siembran 6 plantas en frascos de 100 ml y 3 plantas en frascos de 200 ml. con valores respectivos de 1.90 y 1.30 cm. Aunque no reflejan diferencias estadísticas con el resto de interacciones tipo de frasco y número plantas por frasco. En la combinación frascos de 200 ml conteniendo 3 plantas, se registró el menor promedio de emisión de hojas (1.16). No se reportaron diferencias significativas entre los demás tratamientos. El número de brotes producidos por plantas en las combinaciones frascos de 100 y 200 ml con 5 y 6 plantas por frasco, superaron a las combinaciones frascos de 100, 200 y 300 ml. conteniendo 3 y 4 plantas. George (1993) afirma que el tamaño y forma del envase puede influir directamente en el crecimiento

de los tejidos *in vitro*. El tamaño óptimo del recipiente está en dependencia del tipo de material, de la especie que está siendo multiplicada y puede ser determinado experimentalmente (Figura 5 y 6) (Foto3).

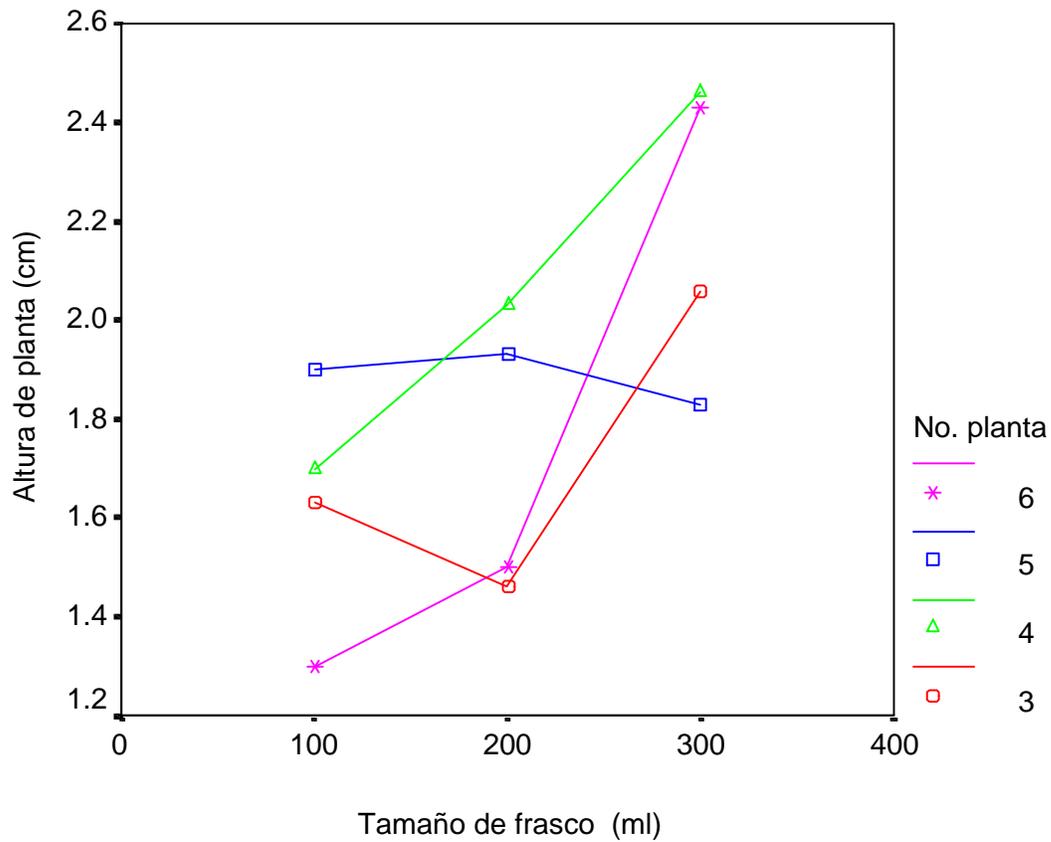


Figura 5. Efecto de tres tipos de frasco y diferentes número de plantas por frasco en las variable altura de planta, en la fase de multiplicación.

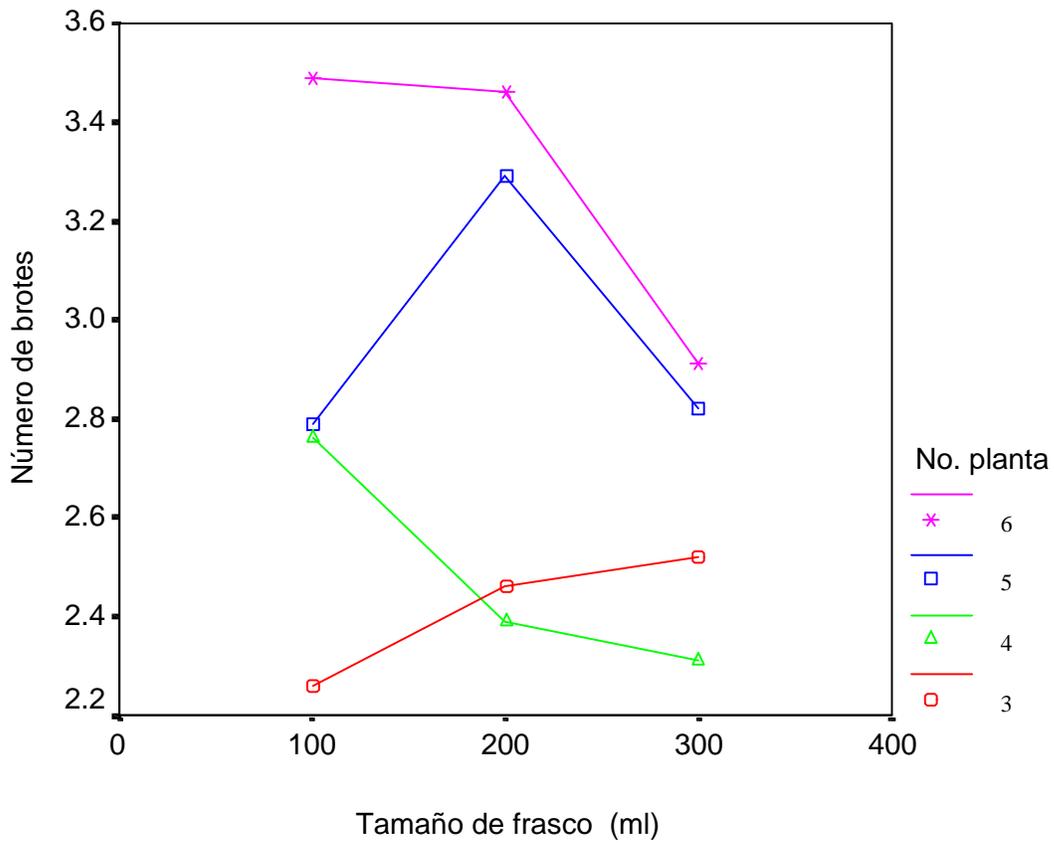


Figura 6. Efecto de tres tipos de frasco y diferentes número de plantas por frasco en las variable número de brotes, en la fase de multiplicación.



Foto 3. Tipos de frascos utilizados en la fase de multiplicación de 100, 200 y 300 ml (izquierda a derecha).

La producción de brotes en el frasco de 300 ml se ve limitada posiblemente por el tipo de material plástico con que es elaborado, debido a que impide que gran parte del espectro de luz llegue hasta los tejidos implantados, además que parece que el hermetismo dentro de la cámara limita el intercambio gaseoso con el medio ambiente externo porque se produce la acumulación de gotas de agua en las paredes internas del frasco. El tamaño mínimo de los frascos en la fase de multiplicación de acuerdo con Chun (1986) debe tener capacidad de 60 a 100 ml, aunque los mejores resultados se obtienen en frascos con menos de 200 ml de capacidad. George (1993) destaca que la humedad relativa dentro del frasco que contienen brotes está en dependencia del área total de las hojas y sobre todo del número y tamaño de brotes por frasco. Evert y Holt (1975) citados George (1993) observaron que normalmente el crecimiento *in vitro* en frascos grandes es mejor cuando contiene muchos brotes, los cuales juntos ayudan a mantener una adecuada humedad relativa.

3.3- Fase de enraizamiento

En las variantes medio de cultivo con 0, 1 y 2 mg/l de AIA pero sin sacarosa la variable altura de planta resultó inferior estadísticamente con valores de 0.767 cm, 0.983 cm y 0.217 cm. respectivamente. Entre los otros tratamientos no se registraron diferencias estadísticas significativas; aunque fue evidente que cuando se combinaron las diferentes dosis de sacarosa y AIA se incrementó la altura de planta. En la variable número de hojas únicamente resulto inferior estadísticamente, en el medio de cultivo con 2 mg/l AIA sin sacarosa, aunque no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos con 0 y 1 mg/l AIA ambos sin sacarosa. El mejor promedio de brotes se obtuvo en el medio con 2 mg/l AIA y 50 g/l sacarosa con cinco brotes superando a las obtenidas en los medios a los que se adicionaron combinaciones de 0, 1 y 2 mg/l AIA con 30 g/l sacarosa y sin sacarosa. El porcentaje de plantas enraizadas fue mayor tanto en la variante de medios de cultivo que únicamente contenía sacarosa o en las variantes que combinaban sacarosa con AIA. Este comportamiento se debe a que la sacarosa es la principal fuente de energía para los tejidos *in vitro* (Figuras 7 y 8) (Foto 4).

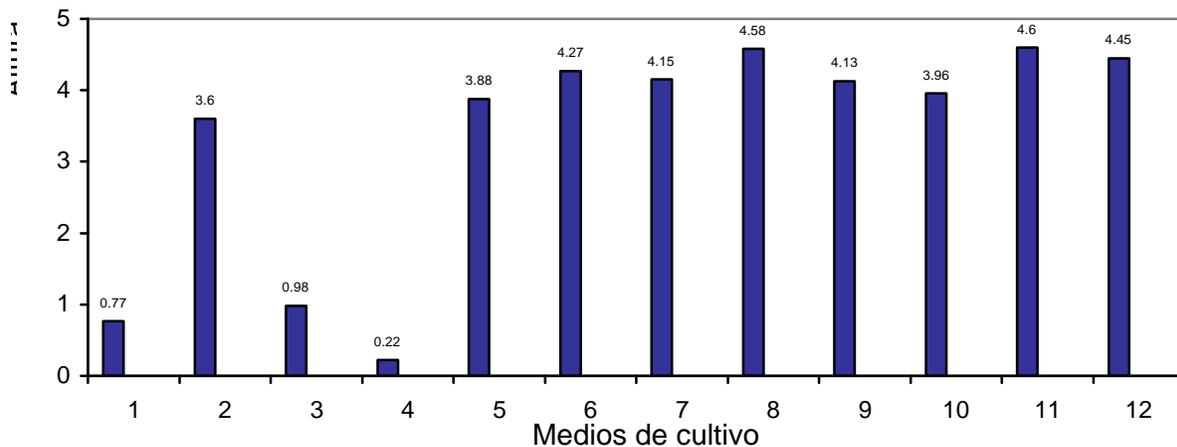


Figura 7. Efecto de doce variantes de medios de cultivo en la variables altura de planta, en la fase de enraizamiento.

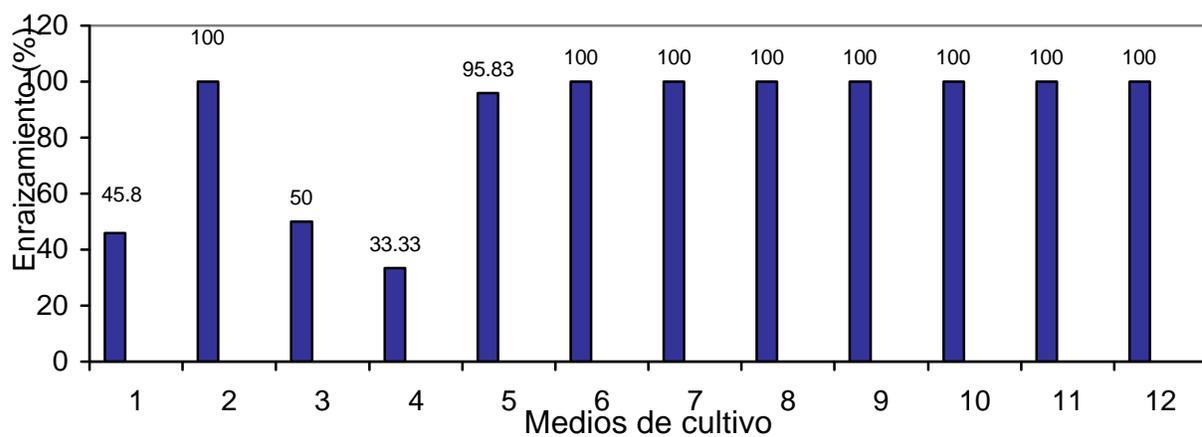


Figura 8. Efecto de doce variantes de medio de cultivo en el enraizamiento de plátano cv. Enano a las tres semanas.

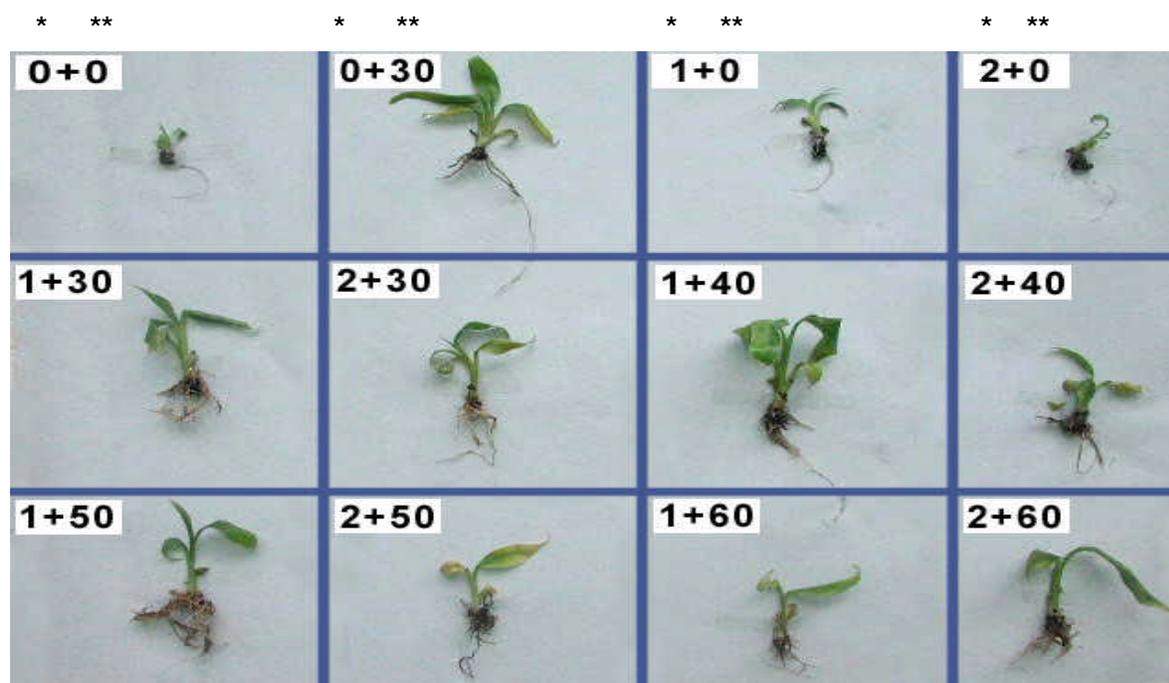


Foto 4. Representación de plántulas de Plátano cv. Enano en doce variantes de medio MS suplementado con AIA y sacarosa en la fase de (* = AIA; ** = sacarosa).

En base a la buena respuesta de los tejidos a la combinación de niveles de sacarosa con AIA se debe posiblemente al efecto sinérgico que se produce cuando se combinan estas dos sustancias. En la mayoría de los medios de cultivo para enraizamiento se recomienda elevar la concentración de sacarosa para lograr un crecimiento vigoroso de las raíces. En caña de azúcar se reporta un abundante enraizamiento en medios que contengan entre 5 y 9 % de sacarosa (Maretzki e Hiraki, 1980; Ballester y González, 1983).

3.4- Fase de aclimatación

Se considera sustrato a los materiales sólidos o porosos de origen natural o sintéticos que solos o combinados garantizan un adecuado crecimiento de las plantas bajo condiciones ambientales controladas. Estos tienen como función suministrar a la planta sostén mecánico, a la vez permitir que las raíces tomen aire y agua, este puede o no intervenir en el complejo proceso de nutrición vegetal (Tortosa, 1990).

El objetivo principal de la fase de aclimatación es lograr la sobrevivencia de las plantas al momento del trasplante y crecimiento de la misma; etapa en las que las plantas están forzadas a ser autótrofas y sintetizar los compuestos orgánicos; a partir de minerales, agua, CO₂ y luz. Este cambio en la planta así como la morfología de la misma determina la susceptibilidad durante las etapas inicial del proceso de aclimatación (Agramonte, 1997).

Con las plantas que se desarrollaron en la fase de enraizamiento en las diferentes variantes de medios de cultivo, se estudió el comportamiento de éstas a las condiciones ambientales en base a la expresión de las variables altura, número de hojas y sobrevivencia de las vitroplantas. En el ANDEVA practicado a las variables altura de planta y número de hojas, se observó que por efecto de las variantes de medio de cultivo, se registraron diferencias estadísticas significativas. Tanto en altura como en número de hojas, las variantes de medio de cultivo que contenían diferentes niveles de sacarosa en combinación con 1 o 2 mg/l de AIA, se adaptaron a las condiciones ambientales. De acuerdo a la separación de medias de Tukey $\alpha = 0.05$, la variable número de hojas registró el mayor valor en relación a la altura (Tabla 12) (Foto 5).

Tabla 12 Efecto de doce (12) variantes de medio de cultivo en la aclimatación de vitroplantas de Plátano cv. Enano a las cuatro (4) semanas.

Concentración		Altura de planta (cm)	Nº de hojas		Sobrevivencia de vitroplantas%
AIA (mg/l)	Sacarosa (g/l)				
0	0	0 b	0	c	0
0	30	2.37 a	1.33	b	56
1	0	0 b	0.0	c	0
2	0	0 b	0.0	c	0
1	30	2.48 a	2.26	ab	47.8
2	30	2.45 a	2.33	ab	52.17
1	40	2.41 a	2.33	ab	66.66
2	40	2.84 a	2.73	ab	79.16
1	50	2.66 a	3.13	a	100
2	50	1.727 a	2.40	ab	84
1	60	3.08 a	3.20	a	86.66
2	60	2.77 a	2.8	a	100
ANDEVA		*	*		
C. V		20.84	23.61		
R²		0.69	0.64		

Medias con letras en común no difieren significativamente entre sí. Tukey $\alpha = 0.05$

Igual que en las variables altura y número de hojas, en los medios sin adición de sacarosa no se observó sobrevivencia de las vitroplantas, únicamente en los medios con 1 mg/l de AIA con 50 g/l de sacarosa y 2 mg/l AIA con 60 g/l sacarosa se obtuvo el 100% de sobrevivencia.



Foto 5. Efecto de la concentración de sacarosa en el la adaptación de plántulas en la fase de aclimatación; plantas con 30, 40 50 y 60 g/l de sacarosa (izquierda a derecha).

Estos resultados sugieren la importancia de agregar sacarosa desde la fase de enraizamiento en concentraciones superiores a los 30 g/l en combinación de 1 ó 2 mg/l de AIA. Jiménez (1995) considera que las vitroplantas procedentes de medio de cultivos con mayores concentraciones de sacarosa presentan, mayor sobrevivencia al ser sembradas en la fase de aclimatación, debido a una mayor adaptación para soportar el estrés hídrico, motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unido a una mejor constitución morfológica de la vitroplanta.

IV. CONCLUSIONES

- a. En el medio de cultivo sin adición de AIA y BAP el grado de fenolización se manifestó únicamente en las paredes de los ápices establecidos. No se observó crecimiento de los ápices en las cinco variantes de medio de cultivo.
- b. En la fase de establecimiento, a las ocho semanas en el medio de cultivo suplementado con 0.30 mg/l AIA + 1 mg/l BAP se produjo la mayor diferenciación de los ápices a plantas en un 53.34% de las cuales el 26.66% emitieron brotes.
- c. En la fase de multiplicación los medios de cultivos con adiciones de 3, 4 y 5 mg/l BAP se produjeron los mayores promedios de brotación por planta en los cinco subcultivos.
- d. En el medio de cultivo de consistencia semisólida suplementado con 5 mg/l BAP se produjo el mejor promedio de brotes por planta (5.80), superando a los promedios obtenidos en las variantes de medio de cultivo de consistencia líquida y a las de consistencia semisólida con 0 y 1 mg/l de BAP.
- e. En la fase de enraizamiento y aclimatación los medios de cultivos que contenían combinaciones de 1 y 2 mg/l AIA con 30 a 60 g/l de sacarosa favorecieron el incremento en altura, número de hojas en ambas fases y la sobrevivencia en la aclimatación.

V. RECOMENDACIONES

- 1- En el establecimiento de ápices, el medio de cultivo MS suplementado con 0.3 mg/l AIA y 1 mg/l BAP resultó más efectivo para la formación de plántulas.
- 2- En la fase de multiplicación, sembrar seis plantas en frascos de 100 y 200 ml en un medio de consistencia semisólida suplementado con 0.3 mg/l AIA y 5 mg/l BAP.
- 3- Adicionar concentraciones de 40-60 g/l de sacarosa en combinaciones con 1 ó 2 mg/l de AIA, en la fase de enraizamiento.
- 4- Realizar estudios de micropropagación con otros genotipos de plátano.
- 5- Realizar estudios de adaptación de las vitroplantas a condiciones de campo para detectar y caracterizar posibles variantes somaclonales reportadas por muchos autores en el cultivo de plátano.

IV- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agramonte, D., 1997. Método biotecnológicos para la producción de semilla original de papa (Solanun Tuberosum L) Var. Désirée. Tesis de Doctorado. Universidad Central de las Villas.
- Águila, L., Pérez, B., Sarriá. Z y García, C. 2002. Alternativas para la propagación *in vitro* del cultivar híbrido FHIA – 20. INFOMUSA 11(1): 35 – 38.
- Aguilar Maradiaga, M. Reyes Castro, G. 1992 Estudio preliminar de la micropropagación en los clones de banano (*Musa sp*) Cavendish (AAA) y Enano Ecuatoriano (AAA). GERMOPLASMA. Revista Informativa anual del Programa de Recursos Genéticos Nicaraguense, Universidad Nacional Agraria. (FAGRO). (Managua – Nicaragua) N°1 64 p.
- Aleman, F., Somarriba., Munguía, R. 1994. Diagnóstico fitosanitario y económico de la producción de Musaceas en el departamento de Rivas. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua. 98 p.
- Ballester, R. y A. Gonzáles. 1983. Comprobación de la eficiencia de nuevos medios de cultivo en el enraizamiento de plantines de caña de azúcar (*Sacharum ssp.* Híbrido) obtenidos por cultivo de tejidos. Trabajo de Diploma. Universidad Central de las Villas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Santa Clara, V.C; Cuba.
- Chun. Y. W. Hall, R.B and Stepheens L. C. 1986. Influences of medium consistency and shoot density on *in vitro* shoot proliferation of *Populus alba P. gradidentata*. Plant cell tiss organ. Cult. S. 119 – 185.
- FAO. 1999. Boletín Trimestral de Estadística. 12 (34).
- George. E. F., 1993. Controlling persistent contaminant in plants. In: Plant. Propagation by Tissue culture, chapter 5, pp. 130-143 part 12^{da} Edition. Energetic. Ltd.
- Gooding. P. Bird. C y Robinson, S. P. 2001. Actividad de la polifenoloxidasas y expresión génica en la fruta de los bananos Goldfinger (AAAB). FAL. 011 Vol10 N° 2, 17p.
- INIBAP. 1997. Annual report. International Network for the improvement of Banana and plantain. Montpellier, France.
- Jiménez, G. E. 1995. Propagación *in vitro* de la caña de azúcar (Sacharum ssp Híbrido). (Tesis) de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara. 93 p.

- Jiménez, G. E. 1997. Propagación vía organogénesis. Etapas de la micropropagación fase 0 o preparativa. Fase 1: establecimiento o iniciación de los subcultivos. Curso internacional de propagación *in vitro* de especies vegetales. Santa Clara, Cuba. 15 – 39 p.
- Jiménez, G. E. 1998. Cultivo de ápices y meristemas. En: propagación y mejora Genética de plantas por biotecnología (Eds) Instituto de Biotecnología de las plantas. Universidad Central de la Villas. Pérez Ponce J. N. (ed) Santa Clara, Cuba. 45 – 46.
- Marezki, a. and P. Hiraki, 1980. Su cose promotion of roots formation in plantlets regeneration from callus of Saccharum spp. Oyton 38 (1) : 85 – 85.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised médium for rapid growth and bioassay with tabacco tissue culture. Physiology Plantarum 15: 443 – 497 p.
- Orellana, P., 1998. Introducción a la propagación masiva. En: propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología (Ed) Instituto de Biotecnología de las plantas, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Pérez Ponce, J. N. 1998. Propagación y mejora Genética de plantas por Biotecnología En: cultivo de ápice y meristemas. Mpresión GEO. Vol 1. Villa Clara, Cuba 46 – 56 Pp.
- Pérez Ponce, J. N., E. Jiménez y D. Agromonte. 1998 Aumento de la eficiencia en la micropropagación. En propagación y mejora genética de plantas por viotecnología. Instituto de Viotecnología de las plantas. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba. 179 – 190 Pp.
- Rodríguez, M. J.; J. R. Lorenzo and A. Garcia, 1987. Significance of physiological History in the vegetative propagation of banana shoot tips. Acta Horticulturæ 212: 61 – 68 Pp.
- Reyes, G. 1995. Micropropagation and *in vitro* conservation of two musa genotypes: Banana (AAA) and plantaian (AAB). Tesis de Maestria. Genetik Centrum. Agricultural Sciences University, Uppsala, Suecia.
- Simmonds, N. W. y Spherd, K. 1955. The taxonomy and origins of the cultivated bananas. Journal of the Linnean of London. Botany (Inglaterra) 55 (359) : 303 - 012
- Simmonds, N. W. 1962. The evolution of bananas. Longmans, London, 170 p.
- Sin – Wan Lee (1998). Micropropagation. Plant tissue culture course, Taiwán. Pág. 3 - 5 Pp.
- Soto, M. 1985. Bananos, cultivo y comercialización. Litografía e Imprenta LTL, S.A. (San José Costa Rica) 627 Pp.

- Tortosa, J. 1990. La turba su caracterización física y química, evaluación para cultivos en contenedor.
Revista Agrícola Vergel 106: 777 – 783.

ANEXOS

Tabla 8 Resultado de la interacción entre los tratamientos medios de cultivo y subcultivos en las variables altura de planta, número de hojas y número de brotes en la fase de multiplicación.

Sub-cultivos	Concentración (mg/l)		Altura de planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes
	AIA	BAP			
1	0	0	2.40 abc	1.83 abc	0.50 efg
	0.3	1	2.32 abc	2.66 a	2.33 b.g
	0.3	2	2.13 a.f	2.75 a	2.50 b.g
	0.3	3	2.62 abc	2.16 a	3.25 b.e
	0.3	4	2.06 a.f	2.41 a	5.17 ab
	0.3	5	2.21 a.f	2.50 a	4.17 ab
2	0	0	2.16 a.f	2.08 ab	0.33 fg
	0.3	1	2.13 a.f	2.25 a	3.5 b.e
	0.3	2	1.87 b.f	1.92 abc	2.83 b.f
	0.3	3	2.21 a.f	2.58 a	3.75 abc
	0.3	4	2.04 a.f	1.92 abc	3.58 b.e
	0.3	5	2.06 a.f	1.66 abc	3.0 b.e
3	0	0	2.92 a	2.25 a	0.83 d.g
	0.3	1	2.05 a.f	2.50 a	3.17 b.e
	0.3	2	2.2 a.f	2.66 a	4.75 ab
	0.3	3	1.80 b.f	2.50 a	5.42 ab
	0.3	4	2.0 a.f	2.33 a	5.0 ab
	0.3	5	1.99 a.f	2.33 a	8.17 a
4	0	0	2.52 abc	2.25 ab	0.50 efg
	0.3	1	2.25 a.e	2.58 a	4.33 ab
	0.3	2	2.28 a.d	2.33 a	3.83 bcd
	0.3	3	1.28 def	1.92 abc	2.75 b.g
	0.3	4	1.70 c.f	2.08 ab	4.0 abc
	0.3	5	1.17 f	1.16 bc	2.50 b.g
5	0	0	2.79 ab	2.0 ab	0.16 g
	0.3	1	2.10 a.f	2.16 a	2.83 b.f
	0.3	2	1.98 a.f	2.16 ab	0.91 c.g
	0.3	3	1.20 ef	1.0 c	2.66 c.g
	0.3	4	1.85 b.f	1.66 abc	3.25 b.f
	0.3	5	2.03 a.f	1.83 abc	4.25 abc
ANDEVA			*	*	*
C.V			32.87	29.94	49.50
R²			0.41	0.38	0.55

Medias con letras en común no difieren significativamente entre sí. Tukey $\alpha = 0.05$

Tabla 9 Resultados de la interacción entre los tratamientos, medios de cultivo y consistencia en las variables altura de planta, número de hojas y número de brotes en la fase de multiplicación.

Consistencia	Concentración (mg/l)		Altura de planta	Número de hojas	Número de brotes
	AIA	BAP			
Líquida	0	0	2.32 abc	2.10 abc	0.23 g
	0.3	1	1.95 bcd	2.47 ab	2.90 cde
	0.3	2	2.06 bcd	2.63 a	2.06 dfe
	0.3	3	1.76 dc	1.87 bc	2.10 ef
	0.3	4	2.08 bcd	2.30 ab	2.73 de
	0.3	5	1.57 d	1.60 c	3.13 cde
Semisólido	0	0	2.80 a	2.07 abc	0.70 fg
	0.3	1	2.39 ab	2.40 ab	3.57 b.e
	0.3	2	2.13 bcd	2.10 abc	3.87 a.d
	0.3	3	1.89 bcd	1.93 abc	5.03 abc
	0.3	4	1.79 cd	1.87 bc	5.67 ab
	0.3	5	2.22 bc	2.20 abc	5.80 a
ANDEVA			*	*	*
C.V			32.87	29.94	49.50
R²			0.41	0.38	0.55

Medias con letras en común no difieren significativamente entre sí. Tukey $\alpha = 0.05$

Tabla 10 Efecto de interacción de los tratamientos tipos de frasco y número de plantas por frasco en las variables altura de planta, número de hojas y número de brotes en la fase de multiplicación.

Frasco (ml)	Nº planta por frasco	Altura (cm)	Nº hojas	Nº de brotes
100	3	1.63 ab	2.66 a	2.26 b
	4	1.70 ab	2.16 a	2.76 ab
	5	1.90 ab	2.66 a	2.79 ab
	6	1.30 c	2.16 a	3.49 a
200	3	1.46 c	1.16 b	2.46 ab
	4	2.03 ab	2.16 a	2.39 b
	5	1.93 ab	2.33 a	3.29 ab
	6	1.50 b	2.16 a	3.46 a
300	3	2.06 ab	2.33 a	2.52 ab
	4	2.46 a	2.83 a	2.31 b
	5	1.83 ab	2.66 a	2.82 ab
	6	2.43 a	2.66 a	2.91 ab
C.V		19.15	11.00	21.44
ANDEVA		*	*	NS
R²		0.613	0.581	0.498

Medias con letras en común no difieren significativamente entre sí. Tukey $\alpha = 0.05$

Tabla 11 Efecto de doce (12) variantes de medio de cultivo en el enraizamiento de plántulas de Plátano cv Enano, a las cuatro (4) semanas.

Concentración		Altura de la planta (cm)	Número de hojas	Número de brotes	Plantas enraizadas %	Emisión y longitud raíces %		
AIA (mg/l)	Sacarosa (g/l)					Corta 0-2 cm	Mediana 2-4 cm	Larga >4 cm
0	0	0.767 b	1.50 ab	0.00 d	45.8	7.72	27.27	0
0	30	3.650 a	3.167 a	2.66 ab	100	4.166	0	95.83
1	0	0.983 b	2.00 ab	0.16 dc	50	100	0	0
2	0	0.217 b	0.833 b	0.83 bcd	33.33	100	0	0
1	30	3.883 a	3.333 a	0.83 bcd	95.83	0	0	100
2	30	4.267 a	3.167 a	0.83 bcd	100	4.166	0	95.83
1	40	4.150 a	2.500 a	2.00 abc	100	4.166	0	95.83
2	40	4.583 a	2.833 a	2.83 ab	100	8.33	0	91.66
1	50	4.133 a	2.333 a	1.50 bcd	100	33.33	0	66.66
2	50	3.967 a	2.333 a	5.00 a	100	8.33	0	91.66
1	60	4.600 a	2.833 a	1.66 abcd	100	29.166	0	70.83
2	60	4.450 a	2.667 a	2.66 abcd	100	29.166	0	70.83
ANDEVA		*	*	*				
C.V		27.47	29.6	63.17				
R²		0.766	0.449	0.493				

Medias con letras en común no difieren significativamente entre sí. Tukey $\alpha = 0.05$



Foto 6 Plántulas del Plátano cv. Eenano en la fase de multiplicación en 6 variantes de medio MS suplementado con una dosis AIA y 5 dosis diferentes de BAP en dos consistencia (líquida y semisólida) y un testigo.



Foto 7 Plántulas antes de ser llevadas al campo, bandeja y bolsa (izquierda a derecha).