



Por un desarrollo Agrario  
y Integral Sostenible

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL**

**Trabajo de Graduación**

**Micropropagación de ápices caulinares en Plátano**  
**(*Musa* spp. AAB) cultivar Cuerno Gigante**

**AUTORES**

**Br. Doribel Chavarría Castillo**

**Br. Gerardo Javier López Montenegro**

**ASESOR**

**Ing. Agr. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga**

**Managua, Nicaragua**

**Septiembre, 2010**



Por un desarrollo Agrario  
y Integral Sostenible

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL**

**Trabajo de Graduación**

**Micropropagación de ápices caulinares en Plátano**  
**(*Musa* spp. AAB) cultivar Cuerno Gigante**

**AUTORES**

**Br. Doribel Chavarría Castillo**

**Br. Gerardo Javier López Montenegro**

**Presentado**

**A la consideración del honorable tribunal examinador  
como requisito para optar al grado de ingeniero  
agrónomo generalista.**

**ASESOR**

**Ing. Agr. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga**

**Managua, Nicaragua**

**Septiembre, 2010**

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la decanatura de la facultad y/o director de sede: \_\_\_\_\_ como requisito parcial para optar al título profesional de:

---

Miembros del tribunal examinador

---

Dr. Victor Aguilar Bustamante  
Presidente

---

MSc. Moisés Blanco Navarro  
Secretario

---

Dr. Nadir Reyes Sánchez  
Vocal

Lugar y Fecha (día/mes/año) \_\_\_\_\_

## ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
<b>DEDICATORIA</b>	i
<b>AGRADECIMIENTO</b>	iii
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	iv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	v
<b>RESUMEN</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>I- INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>II- OBJETIVOS</b>	3
<b>IV- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	5
4.1. Localización del experimento	5
4.2. Esterilización de materiales y equipos	5
4.3. Fase de establecimiento	5
4.3.1. Selección del material vegetativo	5
4.3.2. Preparación y desinfección del material vegetativo	5
4.3.3. Siembra del material vegetativo	6
4.3.4. Medios de cultivo	6
4.4. Fase de multiplicación	7
4.4.1. Efecto de los medios de cultivo, en la producción de brotes axilares	7
4.4.2. Efecto del volumen del frasco y el número de explantes por frasco en la fase de multiplicación	8
4.5. Fase de enraizamiento	8
4.6. Aclimatación de plantas	9
4.7. Diseño experimental y análisis estadístico	10
4.7.1. Fase de establecimiento	10
4.7.1.1. Variables evaluadas	10
4.7.2. Fase de multiplicación	10
4.7.2.1. Variables evaluadas	11
4.7.3. Fase de enraizamiento	11
4.7.3.1. Variables evaluadas	11
4.7.4. Aclimatación de las plantas	12
4.7.4.1. Variables evaluadas	12
<b>V- RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	13
5.1. Fase de establecimiento	13
5.2. Fase de multiplicación	19
5.2.1. Efecto de los medios de cultivos en la producción de brotes axilares, número de hojas y longitud del brote en cuatro subcultivos	19
5.2.1.1. Primer subcultivo	19
5.2.1.2. Segundo subcultivo	20

5.2.1.3. Tercer subcultivo	21
5.2.1.4. Cuarto subcultivo	22
5.2.2. Efecto del volumen de frasco y número de plantas por frasco en la fase de multiplicación	27
5.3. Fase de enraizamiento	30
5.4. Fase de aclimatación	34
5.4.1 Correlaciones entre las variables longitud del pseudotallo, número de hojas, número y volumen de raíces.	35
<b>VI- CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
<b>VII- RECOMENDACIONES</b>	<b>39</b>
<b>VIII- LITERATURA CITADA</b>	<b>40</b>

## **Dedicatoria**

Dedico este esfuerzo a mi familia en especial a mis padres **Manuel de Jesús Chavarría López y Fanny del Carmen Castillo Cruz** como un reconocimiento por su paciencia y sacrificio brindándome su apoyo, confianza y cariño incondicional a lo largo de toda mi vida

A mis amigos y amigas que han servido de apoyo en el transcurso de mi vida para lograr las metas propuestas, aconsejándome e impulsando en momentos difíciles, a la persona más importante en mi vida a mi hijo Fernando Josué quien ha sido inspiración para culminar mis estudios y seguir adelante en mi vida.

**Doribel Chavarría Castillo**

## **Dedicatoria**

Quiero agradecer a Dios por permitirme alcanzar mis objetivos, gracias Señor por el tiempo, por ser mi guía y luz en mis senderos, por ti he llegado hasta donde estoy.

A mis padres **Arcadia Montenegro Zeledón** y **Gerardo López Blandón**, a mis hermanas, a tíos en especial a mi tía **Margarita López Blandón** por darme el apoyo en los días duros de mi vida, a mis primos y abuelos; en si a toda mi gran familia que tengo, gracias a sus oraciones hoy e alcanzado una de las grandes metas y que me ha servido de mucho en el transcurso de mi vida como estudiante universitario.

También quiero expresar mi gratitud a mi tutor Ingeniero Marbell Aguilar Maradiaga por darme la oportunidad de ser discípulo de una persona tenaz muy profesional y con gran espíritu de responsabilidad, gracias profesor le estaré eternamente agradecido.

De igual forma quiero agradecer el apoyo del Ing. Roberto Blandino por el respaldo que me brindo cuando fui un integrante de Radio Maíz, a mi novia Angela Duarte por ser apoyo físico y en oraciones en el transcurso de mi tesis, a mis amigos de mi barrio, a las pi y amigos de la universidad y a todos las personas sinceras y nobles de corazón que (por motivos) no los puedo mencionar los quiero mucho gracias por todo.

**Gerardo Javier López Montenegro**

## **Agradecimiento**

A **Dios** por guiarnos brindándonos su ayuda y apoyo incondicional en el transcurso de nuestra vida.

A los docentes que contribuyeron a nuestro desarrollo profesional en el transcurso de nuestra carrera universitaria.

A dirección de servicios estudiantiles (**DSE**) en especial a la Lic. Idalia Casco por haber contribuido a nuestra formación facilitando la adquisición de beca interna en nuestro periodo académico.

A nuestro asesor Ing. Agr. Marbell Aguilar Maradiaga por habernos apoyado en nuestra tesis compartiendo sus conocimientos, experiencias, y su confianza facilitando la culminación de nuestros estudios.

Al Ing. Agr. Álvaro Benavides por haber realizado el análisis estadístico de los datos.

Al equipo de trabajo de laboratorio de cultivo de tejidos que nos sirvieron de guías brindando consejos y recomendaciones en la realización del experimento.

A Radio Maíz por el apoyo con el préstamo de computadoras en el desarrollo del 5to año de la carrera y durante la tesis.

**Doribel Chavarría Castillo**

**Gerardo Javier López Montenegro**

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADROS		PÁGINA
1.	Variantes del medio de cultivo en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de ápices de plátano ( <i>Musa</i> AAB.) cultivar Cuerno Gigante.	7
2.	Variantes de medios de cultivo en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> del Plátano cultivar Cuerno Gigante.	8
3.	Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de Plátano cultivar Cuerno Gigante.	9
4.	Efecto de seis variantes de medios de cultivo en el grado de fenolización, porcentaje de plantas formadas, ápices en crecimiento a los 15 y 30 días de establecidos.	17
5.	Efecto de las seis variantes de medio de cultivo durante el primer subcultivo en las variables longitud del pseudotallo, número de brotes y hojas en la fase de multiplicación.	20
6.	Efecto de las seis variantes de medio de cultivo durante el segundo subcultivo en las variables longitud del pseudotallo, número de brotes y hojas en la fase de multiplicación.	21
7.	Efecto de las seis variantes de medio de cultivo durante el tercer subcultivo en las variables longitud del pseudotallo, número de brotes y hojas en la fase de multiplicación.	22
8.	Efecto de las seis variantes de medio de cultivo durante el cuarto subcultivo en las variables longitud del pseudotallo, número de brotes y hojas en la fase de multiplicación.	23
9.	Efecto del volumen del frasco y número de explantes por frascos en las variables número de hojas, brotes y longitud del brote principal en plátano cultivar Cuerno Gigante.	28
10.	Cálculo de producción de plantas proyectada mediante la fórmula propuesta por Aragón.	29
11.	Efecto de AIA, sacarosa y consistencia de los medios de cultivo en las variables longitud del pseudotallo, número de hojas, brotes y raíces en el cultivar de plátano Cuerno Gigante.	32
12.	Correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables número de hojas, volumen de raíces, número de raíces y longitud del pseudotallo.	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1.	Izquierda: rebrote extraído de la planta madre. Centro: reducción del tamaño del corno. Derecha: dimensión de ápice caulinar previo a la desinfección en la fase de establecimiento.	6
2.	Bolsas de polietileno conteniendo el sustrato de compost.	9
3.	Grados de fenolización en ápices caulinares del plátano cultivar Cuerno Gigante. <b>a</b> : sin fenoles. <b>b</b> : grado leve. <b>c</b> : grado alto.	14
4.	Plantas formadas en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de ápices caulinares de plátano cultivar Cuerno Gigante.	16
5.	Tendencia del número de brotes en plátano cultivar Cuerno Gigante en los cuatros subcultivos.	24
6.	Tendencia del número de hojas en plátano cultivar Cuerno Gigante en los cuatros subcultivos.	25
7.	Tendencia de longitud del pseudotallo del plátano cultivar Cuerno Gigante en los cuatros subcultivos.	26
8.	Producción de brotes en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> en plátano cultivar Cuerno Gigante.	26
9.	Fase de multiplicación del plátano cultivar Cuerno Gigante. Izquierda: frasco con capacidad de 430 ml. Derecha: frasco con capacidad de 220 ml.	30
10.	Plantas en fase de enraizamiento. Arriba: variantes de medios de cultivo de consistencia semi-sólida (1-9). Abajo: variantes de medios de cultivo de consistencia líquida (1-9).	33

## RESUMEN

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria de diciembre 2008 a enero 2010. En el centro experimental de FAGRO se seleccionaron hijos de plátano (*Musa* spp AAB) cultivar Cuerno Gigante para el estudio de los diferentes factores en las cuatro fases de la micropropagación. En el establecimiento se evaluó el efecto del Bencil amino purina y Ácido indolacético. En multiplicación se estudió la respuesta de los tejidos a los medios de cultivo, volumen del frasco, número de plantas por frasco y número de subcultivos. En la fase de enraizamiento se evaluó el efecto del AIA y sacarosa en la producción de raíces, y en la fase de aclimatación las correlaciones entre variables morfológicas. Los datos de establecimiento se analizaron en Cuadros porcentuales, en las fases de multiplicación y enraizamiento con el diseño bloques completos al azar, se determinaron los mejores tratamientos mediante el análisis de Duncan y Waller. Todos los ápices establecidos segregaron fenoles y en el medio con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP la formación de plantas fue del 20%. A partir del segundo subcultivo los medios que contenían  $2 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP incrementaron los porcentajes de brotación. Con 5 y 7 plantas por frasco de 220 y 430 ml se obtuvieron los mejores promedios de brotación axilar, longitud del pseudotallo y de número de hojas. Con 7 plantas por frasco se disminuyó en 28.93% la cantidad de frascos y de medios de cultivo en comparación con 5 plantas por frasco. La mejor producción de raíces se consiguió en las sales MS con  $30 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa consistencia semi-sólida. En fase de aclimatación el número de raíces tuvo correlación significativa y positiva con longitud del pseudotallo y volumen de raíces, también hubo correlación positiva y significativa entre número de hojas y longitud del pseudotallo, resultando de gran importancia en la determinación del crecimiento y comportamiento futuro de las plantas.

**Palabras claves:** MS, cultivar, propagación, *in vitro*, AIA, BAP.

## ABSTRACT

The study was conducted in the tissue culture laboratory of the National Agrarian University in December 2008 to January 2010. In the experimental center children were selected FAGRO banana (*Musa spp* AAB) cultivar Giant Horn for the study of different factors in the four stages of micropropagation. The property is assessed the effect of Benzyl amino purine and indole acetic acid. In multiplication, we studied the response of the tissue culture media, bottle volume, number of plants per container and number of subcultures. In the rooting phase, the effect of IAA and sucrose on root production, and the acclimation phase correlations between morphological variables. The data were analyzed in Tables establishment percentage in multiplication and rooting phases in a randomized complete block design, the best treatments were determined by analysis of Duncan and Waller. All tips phenols and segregated facilities in the medium with 1 mg l<sup>-1</sup> BAP plant training was 20%. From the second subculture media containing 2 mg l<sup>-1</sup> of BAP increased the percentage of sprouting. With 5 and 7 per bottle of 220 plants and 430 ml were obtained best average of axillary bud, pseudostem length and number of leaves. With 7 plants per container was reduced by 28.93% the number of flasks and culture media compared with 5 plants per jar. The best root production was achieved in MS salts with 30 g sucrose l<sup>-1</sup> semi-solid consistency. Acclimatization phase the number of roots had a significant positive correlation with length of pseudostem and root volume, there were also significant positive correlation between leaf number and pseudostem length, resulting in great importance in determining the future growth and behavior plants.

**Key words:** MS, cultivar, *in vitro*, propagation, IAA, BAP

## I. INTRODUCCIÓN

El plátano (*Musa* spp.) es una fruta tropical originada en el suroeste asiático, perteneciente a la familia de las musáceas, es un híbrido triploide de *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* (Simmonds, 1962). El plátano se cultivaba en el sur de la India alrededor del siglo V antes de Cristo. Fue introducido posiblemente en África del este y oeste, entre los años 1,000 y 1,500 de la era cristiana. Finalmente llegó al Caribe y Latinoamérica, poco después del descubrimiento del continente (FAO, 2000).

Los bananos y plátanos son de los cultivos más importantes en el mundo en cantidad producida (86 millones de toneladas al año) y en número de hectáreas cultivadas (10 millones). Ocupa el cuarto lugar de importancia mundial antecedido únicamente por el arroz (*Oriza sativa*), el trigo (*Triticum aestivium*) y el maíz (*Zea mays*). La mayoría de esta producción es consumida como producto en la dieta básica para millones de personas en África, Asia, América Latina y el Caribe (CATIE, 2005).

En Nicaragua, el cultivo de plátano se concentra en la región del Pacífico principalmente en los departamentos de Rivas y Chinandega donde se cultivan 13,916 ha que están distribuidas en 83 ha de banano, 8,500 ha de plátano y 5,416 ha de guineo (MIFIC, 2007). Contribuyendo con el 70% de la producción nacional destinada la mayor parte para el consumo interno (MAGFOR, 1990).

El Plátano Cuerno Gigante y Cuerno Enano, son los que más se cultivan en Nicaragua, con una buena aceptación en el mercado nacional; sin embargo el uso de semilla de mala calidad ha provocado una reducción drástica en los rendimientos de estos cultivares debido al ataque de plagas como el picudo (*Cosmopolites sordidus*), nemátodos (*Rodophulus similis*), etc.; como también por enfermedades como la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*), mal de panamá (*Fusarium oxysporum*); que impiden la obtención de altos rendimientos, causando pérdidas a los agricultores (Alemán *et al.*, 1994).

Los productores plataneros extraen de la plantación material vegetativo conocidos como hijos de espada o cola de burro. Entre los inconvenientes de estas prácticas están el desanclaje de la madre, competencia por nutrientes entre la planta madre y vástago; además de la inversión en

tiempo y mano de obra en por la extracción del material vegetativo y por el alto riesgo de diseminación de plagas y enfermedades (Aguilar y Reyes, 2004).

Los plataneros establecen el cultivo con semilla de origen calidad desconocida, generalmente a partir del intercambio de semilla, sin tomar en cuenta los procesos necesarios de selección y multiplicación. Esto ha favorecido a que las plantaciones de plátano estén conformadas por plantas de diferentes calidades y sean fuente de diseminación de plagas y enfermedades transmitidas a través del material de siembra (Aguilar y Reyes, 2004).

Las técnicas de cultivos de tejidos constituyen una de las aplicaciones prácticas más importantes de la biotecnología para la obtención de grandes volúmenes de material vegetal partir de un ápice (explante), en la propagación de plátanos y bananos libres de plagas y enfermedades fúngicas y bacterianas, así como la conservación y el intercambio de germoplasma constituyen importantes aplicaciones de estas técnicas (Vuylsteke y de Langhe, 1985; Grisales, 1994).

Las plantas propagadas por cultivo *in vitro* tienen ciertas ventajas tales como: entran en producción antes que las plantas propagadas convencionalmente, producen al menos en el primer y segundo ciclo racimos de mayor peso que las propagadas tradicionalmente, lo que es muy importante para mejorar la rentabilidad de la plantación (Smith y Hamill, 1989; Robinson y Anderson, 1991).

El plátano y el banano son quizás unas de las especies más micropropagadas a nivel mundial. Así la micropropagación facilita: transferir al campo material más sano, libre de plagas y enfermedades, disponer de material de siembra en cualquier época del año, multiplicar aceleradamente genotipos deseables, transportar fácilmente los propágulos, uniformar las plantaciones, obtener cosechas más precoces y mayores producciones (Sandoval, 2001).

## II. OBJETIVOS

### General

Estudiar los diferentes factores que participan en el proceso de micropropagación de ápices caulinares en el plátano cultivar Cuerno Gigante.

### Específico

1. Definir las mejores concentraciones de reguladores de crecimiento en las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento *in vitro* de ápices caulinares del plátano cultivar Cuerno Gigante.
2. Evaluar el comportamiento del plátano cultivar Cuerno Gigante en la fase de multiplicación de acuerdo a la respuesta de los tejidos al número de plantas por frasco y al volumen del frasco.
3. Hacer uso del análisis de correlación para medir la intensidad de relación existente entre variables morfológicas en plátano cultivar Cuerno Gigante durante la fase de aclimatación.

### III. HIPÓTESIS

**Ho:**

En la micropropagación de plátano (*Musa* spp. AAB) cultivar Cuerno Gigante, no se obtendrán diferencias significativas en los tratamientos estudiados en las fases de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación.

**Ha:**

En la micropropagación de plátano (*Musa* spp. AAB) cultivar Cuerno Gigante, se obtendrán diferencias significativas en los tratamientos estudiados en las fases de establecimiento, multiplicación, enraizamiento y aclimatación.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Localización del experimento**

La producción *in vitro* de plantas de plátano cultivar Cuerno Gigante se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Facultad de Agronomía de la UNA, ubicado en el km. 12 ½ carretera Norte, Managua. El estudio se realizó en el periodo comprendido diciembre 2008 - enero 2010.

### **4.2. Esterilización de materiales y equipos**

En la limpieza de la cristalería se utilizó hipoclorito de sodio ( $\text{NaClO}_3$ ) al 1% durante 24 horas, después se realizó un enjuague con agua y detergente, posteriormente se dejaron escurrir durante 2 horas para eliminar los residuos de agua. Previo a la siembra *in vitro* de los tejidos, los medios de cultivo se esterilizaron en el autoclave a 120 °C a una atmósfera de presión durante 15 minutos; los platos petri, pinzas y bisturís se esterilizaron en el horno a temperaturas de 170 °C durante 1 hora. Antes de la siembra de los tejidos se desinfectó la cámara de flujo laminar con alcohol al 70%, posteriormente se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos.

### **4.3. Fase de establecimiento**

#### **4.3.1. Selección del material vegetativo**

El material vegetativo del cultivar de plátano Cuerno Gigante se obtuvo del área experimental de la escuela de producción vegetal de la facultad de agronomía, se seleccionaron renuevos conocidos como hijos de espada con tamaño entre 40 a 50 cm de altura, de buen estado morfológico y fisiológico. Los renuevos se extrajeron de plantas madres con racimos de más de 25 dedos.

#### **4.3.2. Preparación y desinfección del material vegetativo**

Con machete se realizaron cortes en el cormo y en el pseudotallo, posteriormente se redujeron los tejidos hasta 4 a 5 cm de longitud por 2 a 3 cm de ancho. Para desprender los residuos de polvos y de otras impurezas en los tejidos se lavaron con agua del grifo agregándoles cuatro gotas de surfactante Tween 20 durante 20 minutos. La desinfección se realizó en cloro comercial (2%) durante 5 minutos. Luego en la cámara de flujo laminar se les realizó tres enjuagues sucesivos con agua estéril, finalmente sobre platos petri previamente esterilizados se efectuó la reducción

de los explantes hasta dejar los ápices caulinares con un tamaño aproximado de 0.5 cm (Figura 1).



**Figura 1.** Izquierda: rebrote extraído de la planta madre. Centro: reducción del tamaño del cormo. Derecha: dimensión de ápice caulinar previo a la desinfección en la fase de establecimiento.

#### **4.3.3. Siembra del material vegetativo**

Los explantes se sembraron individualmente en tubos de ensayo con dimensiones de 15 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro, adicionando a cada tubo 10 ml de medio de cultivo, posterior a la siembra fueron trasladados al cuarto de crecimiento en condiciones de  $27 \pm 3$  °C y luz natural. 15 días después de haberse establecido los ápices caulinares, con ayuda de escalpelo se procedió a eliminar los residuos de fenoles de la parte basal, además a cada tejido se le practicó un corte longitudinal. Se consideran ápices caulinares en crecimiento activo a los explantes que presentan coloración verde con abultamiento o desprendimiento de primordios de hojas.

#### **4.3.4. Medios de cultivo**

Las seis variantes de medios de cultivo se definieron en base a la propuesta de Caldera y López (2002) (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Variantes del medio de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro* de ápices de plátano (*Musa* AAB.) cultivar Cuerno Gigante

Variantes del medio MS (1962)	* AIA (mg l <sup>-1</sup> )	**BAP (mg l <sup>-1</sup> )
1	0.0	0.0
2	0.5	0.0
3	1.0	0.0
4	0.5	1.0
5	1.0	1.0
6	0.0	1.0

\* Ácido indolacético, \*\* bencil amino purina, MS= Murashige y Skoog

#### 4.4. Fase de multiplicación

Se efectuaron dos experimentos: en el primero se definió el mejor medio de cultivo en base al promedio de brotes axilares producidos por planta y características morfológicas que presentaban estas plantas. En el segundo experimento se evaluó el promedio de brotes axilares por efecto de dos volúmenes de frascos y del número de tejidos por frasco.

##### 4.4.1. Efecto de los medios de cultivos sobre la producción de brotes axilares

Se estudió la respuesta de las plantas, por efectos del medio de cultivo de consistencia semisólida y la adición de seis concentraciones de BAP, cuatro concentraciones de AIA durante cuatro subcultivos sucesivos (Cuadro 2). Para este estudio se utilizaron frascos con volumen de 220 ml, adicionando 15 ml de medios de cultivo por frasco.

**Cuadro 2.** Variantes de medio de cultivo en la fase de multiplicación *in vitro* de plátano cultivar Cuerno Gigante

Variantes de medio MS (1962)	Reguladores de crecimiento	
	*BAP (mg l-1)	**AIA (mg l-1)
1	0	0.00
2	1	0.00
3	1	0.25
4	1	0.50
5	2	0.00
6	2	0.25
7	2	0.50

\* Ácido indolacético, \*\* bencil amino purina, MS= Murashige y Skoog

#### 4.4.2. Efecto del volumen de frasco y el número de explantes por frasco en la fase de multiplicación

Se estudió la respuesta al ahijamiento de las plantas por efecto de dos tipos de frascos con capacidades de 220 y 430 ml y número de plantas por frasco (5, 6 y 7). Como medio de cultivo básico se utilizaron las sales MS (1962) suplido con 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP que fue el mejor medio de cultivo en la fase de multiplicación de explantes por subcultivos se explica en el inicio 4.4.1.

#### 4.5. Fase de enraizamiento

El objetivo de esta fase es lograr que las plantas emitan suficiente cantidad de hojas y raíces, para facilitar la absorción de agua y nutrientes del sustrato, ayudando a la adaptación de las plantas a las condiciones ambientales (Juárez y Zamora, 2008).

A partir de las plantas obtenidas en la fase de multiplicación se estudiaron los efectos que se produjeron en el crecimiento de las plantas cuando se adicionaron nueve variantes de medio conteniendo diferentes combinaciones de AIA y sacarosa, así como el efecto de dos consistencias de medio de cultivo (líquida y semi-sólida). Las variantes de los medios de cultivo se prepararon en base a estudios realizados por Caldera y López (2002) en el cultivar Plátano Cuerno Enano.

**Cuadro 3.** Variantes de medios de cultivo utilizados en la fase de enraizamiento *in vitro* de plátano cultivar Cuerno Gigante

Variantes del medio MS (1962)	Consistencia del medio	Reguladores de crecimiento	
		*AIA (mg l-1)	Sacarosa (g l-1)
1	Semisólida y líquida	0.0	30
2		0.5	30
3		1.0	30
4		0.0	40
5		0.5	40
6		1.0	40
7		0.0	50
8		0.5	50
9		1.0	50

\*= ácido indolacético, MS= Murashige y Skoog

#### 4.6. Aclimatación de las plantas

En esta fase se pretende lograr un alto porcentaje de sobrevivencia y adaptación de las plantas al medio ambiente externo. Esta fase es considerada una de las más importantes en la micropropagación (Caldera y López, 2002).

En el estudio se evaluaron 30 plantas provenientes de la fase de enraizamiento, las plantas enraizadas se extrajeron de los frascos y se lavaron con agua para eliminar los residuos de agar y sacarosa. Las plantas fueron sembradas en bolsas de polietileno de color negro con dimensiones de 4 x 8 cm conteniendo un sustrato de compost, posteriormente fueron trasladados al sombreadero donde se les suministró un riego diario, permaneciendo en esta condiciones durante 8 semanas.



**Figura 2.** Bolsas de polietileno conteniendo el sustrato de compost.

## **4.7. Diseño experimental y análisis estadístico**

### **4.7.1. Fase de establecimiento**

En la fase de establecimiento se colocó un ápice por tubo de ensayo con un número de 20 plantas por variante de medio de cultivo. Para el análisis de los datos no paramétricos se utilizaron cuadros porcentuales. Se realizaron dos evaluaciones: la primera se efectuó a 15 días después de haber inoculado los ápices y la segunda a los 30 días.

#### **4.7.1.1. Variables evaluadas**

- a.** Grado de fenolización: (levemente fenolizados, altamente fenolizados)
- b.** Porcentaje de contaminación
- c.** Ápices en crecimiento
- d.** Porcentaje de plantas formadas

### **4.7.2. Fase de multiplicación**

En esta fase se realizaron dos experimentos:

**Experimento 1:** Número de subcultivos y variantes de medios de cultivo.

Cada unidad experimental se constituyó por 25 plantas para cada variante de medio de cultivo y en cada frasco se sembraron cinco plantas. Se utilizó en un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo unifactorial, cada bloque conformado por 5 frascos.

Para el análisis estadístico del primer experimento se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) y para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizó la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller  $\alpha = 0.05$ . Los datos fueron procesados y analizados en paquetes estadísticos con Statistical Analysis System (SAS) versión 15.

**Experimento 2:** Volumen de frascos y el número de plantas por frasco.

El número de plantas por bloque, número de frascos por bloque y análisis estadístico fueron similares a los empleados en el experimento 1, empleándose en este experimento el diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo bifactorial.

#### 4.7.2.1. Variables evaluadas

##### Experimento 1

- a. Número de brotes
- b. Longitud del brote principal
- c. Número de hojas por planta

##### Experimento 2

- a. Número de brotes
- b. Longitud del brote principal
- c. Número de hojas por planta
- d. Número de plantas por frasco

Para calcular la cantidad de material a obtener para un subcultivo dado, se utilizó la fórmula propuesta por Aragón (1995) reportada por Suárez (1998).

$$P = MI \times [CM (1 - \%R)]$$

**P**= Producción a obtener.

**MI**= Material inicial que se dispone.

**CM**= Coeficiente o promedio de multiplicación.

**% R**= Porcentaje de pérdidas.

#### 4.7.3. Fase de enraizamiento

Para el estudio se utilizaron frascos con volumen de 220 ml, por cada variante de medio de cultivo y se sembraron cinco plantas por cada frasco. El experimento se estableció en un diseño de bloque completo al azar (BCA), en arreglo bifactorial, cada bloque conformado por cinco frascos y un total de 25 plantas. Se realizó un ANDEVA se definió la mejor variante de medio de cultivo mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con  $\alpha=0.05$ . Las evaluaciones de las variables se realizaron a los 30 días después de la siembra.

##### 4.7.3.1. Variables evaluadas

- a) Longitud del brote principal
- b) Número de hojas por planta
- c) Número de raíces por planta
- d) Número de brotes por planta

#### **4.7.4. Aclimatación de las plantas**

Con el objetivo de conocer las correlaciones existentes entre las variables longitud del pseudotallo, número de hojas, número de raíces y volumen de raíces por medio del desplazamiento de volumen en ml.

Se realizó un análisis estadístico de correlaciones por el método de Pearson en paquetes estadísticos con Statistical Package for Social Sciencien (SPSS) versión 11.5 para Windows. Se evaluaron 30 plantas provenientes de la fase de enraizamiento.

##### **4.7.4.1. Variables evaluadas**

- a) Longitud del pseudotallo
- b) Número de hojas
- c) Número de raíces
- d) Volumen de raíces

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

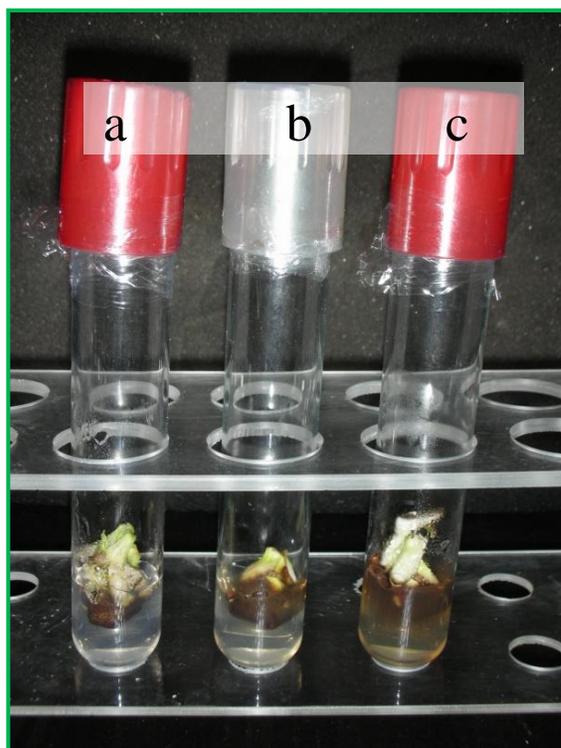
### 5.1. Fase de establecimiento

Dottin (2000) dice que un balance apropiado entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo es necesario para la formación de plantas, 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 explantes.

Un fenómeno que puede constituir un serio problema en el establecimiento y la supervivencia de meristemas y ápices; es la oxidación fenólica que se manifiesta como un ennegrecimiento que comienza por la zona cercana al explante y puede extenderse a todo el medio (George, 1993; Duck y Vaug, 1994). Según Preece y Sutter (1991) los fenoles son liberados a través de los cortes de los tejidos en los explantes, lo que favorece la aparición de un producto fitotóxico de color oscuro debido presencia activa del oxígeno y otros compuestos oxidativos.

A los 15 días se observó que en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento el 50% de los ápices presentaron una fenolización leve, mientras en las otras variantes de medios de cultivo el grado de fenolización alta alcanzó un 55 y 75%. A los 30 días únicamente se redujeron los porcentajes del grado de fenolización alta en los medios de cultivo que contenían  $1 \text{ mg l}^{-1}$  AIA adicionado con o sin adición de  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP con promedios respectivos de 65 y 40% (Cuadro 4).

La fenolización de ápices en 30 días fue superior a los porcentajes de 15 días, debido al corte longitudinal realizado en los explantes que permitió la liberación de compuestos fitotóxicos a través de nuevos cortes en los tejidos (Cuadro 4, y Figura 3).



**Figura 3.** Grados de fenolización en ápices caulinares del plátano cultivar Cuerno Gigante. **a:** sin fenoles. **b:** grado leve. **c:** grado alto.

Los porcentajes de fenolización en los ápices indican que el factor procedencia del material empleado en la fase de establecimiento influyó directamente en la presencia de fenoles durante el experimento, posiblemente al ser extraídos directamente de la planta madre se incrementa la producción de muchas sustancias fenólicas. Varios autores entre ellos, Damásco *et al.* (1984) Sandoval *et al.* (1987) Zamora y Pérez *et al.* (1989); Martínez (1995) mencionan que cuando los ápices provienen directamente de campo son una fuente efectiva para el incremento de la producción de fenoles en la fase de establecimiento.

Jiménez (1998) destaca que los explantes tomados de plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo. A medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro*.

Otro factor determinante en la producción de fenoles es el genotipo se observó a los 30 días de evaluación los ápices segregaron fenoles en grado leve o alto oscilando valores entre 25-75%, cuya resultados difiere a los obtenidos por Caldera y López (2002) que reportan la presencia de fenoles en plátano cultivar Cuerno Enano a concentraciones de hasta 100% en los tejidos. Según Jiménez (1997) el grado de fenolización de los tejidos está en dependencia del genotipo, resultando muy severos en géneros que naturalmente contienen niveles de taninos y otros hidroxifenoles como ocurre en plátano y banano. Pérez *et al.*, (1989) observaron mayor oxidación fenólica en el cultivar Burro CENSA (ABB) que en los cultivares del grupo Cavendish (AAA); por lo que recomiendan utilizar el agua de coco para contrarrestar la fenolización.

De acuerdo a los grados de fenolización en el establecimiento ápices caulinares de plátano cultivar Cuerno Gigante, es necesario experimentar con distintos productos antioxidantes en diferentes dosis en los medios de cultivo y otras alternativas para el manejo de los tejidos. George y Sherrington (1984) recomiendan para disminuir la producción de sustancias fenólicas se debe hacer uso de medios de cultivo de consistencia líquida, además de mantener los tejidos en condiciones de oscuridad.

En el medio que se adicionó  $1 \text{ mg l}^{-1}$  BAP se obtuvo 20% de formación de plantas, los medios con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP + 0.5 ó  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA la formación de plantas fue del 5%, mientras que en los medios que no contenían BAP los ápices no se formaron plantas. Aunque la adición de BAP tuvo mejor resultado en la formación de plantas su efecto no fue significativo debido a los grados de fenolización que presentaron los ápices. Al parecer el tiempo de permanencia de los explantes en los medios resultaron ser insuficientes en la diferenciación de tejidos para obtener plantas formadas (Cuadro 4 y Figura 4).



**Figura 4.** Plantas formadas en la fase de establecimiento *in vitro* de ápices caulinares de plátano cultivar Cuerno Gigante.

En el medio de cultivo que se adicionó  $0.50 \text{ mg l}^{-1}$  AIA se obtuvo el 65% de crecimiento activo, resultando inferior que en las otras variantes cuyo crecimiento osciló de 75-90%.

**Cuadro 4.** Efecto de seis variantes de medios de cultivo en el grado de fenolización, porcentaje de plantas formadas, ápices en crecimiento a los 15 y 30 días de establecidos

Medios de cultivo		Evaluación (días)	Porcentajes de fenolización		Plantas formadas a los 30 días (%)	Ápices en crecimiento a los 30 días (%)
BAP (mg l <sup>-1</sup> )	AIA		Leve	Alto		
0.0	0.0	15	50	50	0	85
		30	35	65		
0.0	0.5	15	45	55	0	65
		30	25	75		
0.0	1.0	15	30	70	0	75
		30	35	65		
1.0	0.0	15	45	55	20	80
		30	35	65		
1.0	0.5	15	40	60	5	75
		30	25	75		
1.0	1.0	15	35	65	5	90
		30	60	40		

Según Jiménez (1998) los microorganismos contaminantes como las bacterias y hongos pueden originarse de dos fuentes distintas, una fuente son los microorganismos que se encuentran en la superficie o en los tejidos de la planta donadora y la segunda fuente es cuando aparecen como resultado de fallas en los procedimientos del laboratorio.

En la fase de establecimiento es indispensable evitar la contaminación de microorganismos, debido a que afectan a los explantes retrasando su desarrollo al competir con ellos o bien por modificaciones que pueden generar en el medio que inciden negativamente en la sobrevivencia y desarrollo de los ápices (Mroginski y Roca, 1991).

Las bacterias fueron los principales microorganismos contaminantes en la fase de establecimiento, a los 15 días se encontró un 29.16% de tejidos afectados por bacterias, una menor incidencia se observó a los 30 días (14.16). En los 15 días los tejidos estaban afectados por hongos de 7.5%, el valor incrementó a 8.33% a los 30 días debido a la dispersión de las esporas de los hongos en los medios de cultivo.

La selección y eliminación de los ápices afectados, limpieza, reducción y corte longitudinal de los ápices sanos que se realizó a los 15 días se explica la reducción de la contaminación. El análisis microbiológico se encontraron hongos como: *Fusarium*, *Rhizopus*, *Penicillium* y las bacterias fueron *Sarcina flava*, *Erwinia* spp y *Pseudomonas* fueron las encontradas. Alvarado (1998) señala que los métodos de desinfección utilizados no siempre eliminan las poblaciones de microorganismos en los tejidos de las plantas *in vitro*, muchos son capaces de permanecer latentes en el interior de las células en los espacios intercelulares o en los haces conductores y quedan protegidos de los agentes químicos. George (1993); Leifert *et al.*, (1994) mencionan los factores que pueden incidir en la contaminación: desinfección deficiente de los explantes, problemas con la esterilización de los medios de cultivo, contaminantes ambientales, deficiente manipulación en las áreas estériles, etc.

Una práctica alternativa para disminuir la pérdida de tejidos en la fase de establecimiento en plátanos y bananos es emplear brotes procedentes de secciones de cormos pre-germinados en un sustrato estéril, que después de ser desinfectado químicamente favorece la sobrevivencia *in vitro* de los ápices, reduciendo a la mitad el tiempo requerido para su establecimiento y disminuye notablemente el número de ápices contaminados (Orellana, 1994). Según Martínez (1995) a partir de diferentes genotipos de plátanos y bananos procedentes de canteros se redujo la duración de la fase I a 12 días, obteniéndose coeficientes de multiplicación superiores a 4, logrando disminuir el número de ápices contaminados a menos de 10%.

## **5.2. Fase de multiplicación**

### **5.2.1 Efecto de los medios de cultivos en la producción de brotes axilares, número de hojas y longitud del brote en cuatro subcultivos.**

Según Pérez (1998) el incremento en el coeficiente de multiplicación en la propagación *in vitro* de plátano disminuye hasta en un 10% los costos de producción.

El balance de los reguladores de crecimiento: auxinas, citoquininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, con un balance adecuado es posible alcanzar elevadas tasas de ploriferación aumentando la efectividad del método de propagación (Orellana, 1998). El uso de citoquininas en el medio de cultivo varía su concentración en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas en los explantes (Hu y Wang, 1983).

#### **5.2.1.1. Primer subcultivo**

No se registraron diferencias significativas en longitud del brote principal, número de brotes axilares y número de hojas. La tendencia de la longitud del brote principal fue a reducirse cuando a las concentraciones de BAP (1 ó 2 mg l<sup>-1</sup>) se adicionan paulatinamente AIA (0.00, 0.25 y 0.50 mg l<sup>-1</sup>). En la brotación axilar los medios de cultivo que se adicionó 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP solo o en combinación con 0.50 mg l<sup>-1</sup> de AIA se obtuvieron promedios superiores a 2, presentando en ambos casos promedios de brotación de 2.28 y 2.08 respectivamente. En las variantes de medios de cultivo que los promedios del número de brotes axilares resultaron inferiores a uno fue en las que no contenían reguladores de crecimiento y en la que se adicionó 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA. En el promedio de número de hojas se obtuvo una respuesta de los tejidos bastante similar a la variable longitud del brote principal (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Efecto de las seis variantes de medios de cultivo durante el primer subcultivo en las variables longitud de la planta, número de brotes y número de hojas en la fase de multiplicación

<b>Variantes de medio MS, (1962)</b>	<b>BAP (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>AIA</b>	<b>Longitud del brote principal (cm)</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Número de hojas</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	1.52 a	0.80 a	2.96 a
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.00</b>	1.46 a	2.28 a	2.88 a
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0.25</b>	1.19 a	0.84 a	2.28 a
<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0.50</b>	1.08 a	2.08 a	2.48 a
<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0.00</b>	1.74 a	1.28 a	3.12 a
<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0.25</b>	1.34 a	1.92 a	2.72 a
<b>7</b>	<b>2</b>	<b>0.50</b>	1.24 a	1.36 a	2.88 a

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para  $p \leq 0.05$ .

#### 5.2.1.2. Segundo subcultivo

En el medio de cultivo que se registró la mayor longitud del brote principal fue en el que no se adicionaron reguladores de crecimiento con 2.68 cm, un segundo grupo con similar respuesta estadística se presentó en las variantes de medios de cultivo con 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP sin adición de AIA con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA y la combinación de 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA con promedios respectivos de 2.10, 1.98 y 2.08 cm. La menor respuesta estadística en la longitud del brote principal se encontró en medios que contenían 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0.50 mg l<sup>-1</sup> de AIA y las adiciones de 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP sin AIA y con 0.50 mg l<sup>-1</sup> de AIA. En la brotación axilar únicamente en las variantes con 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP sin AIA y con 0.5 mg l<sup>-1</sup> AIA se presentaron promedios de brotación superiores a 3 que resultaron significativamente superiores con promedios respectivos de 3.28 y 3.12; la menor respuesta en brotación axilar se obtuvo en el medio de cultivo que no se adicionaron reguladores de crecimiento, únicamente resultando estadísticamente similar al promedio alcanzado en la variante de medio de cultivo que contenía 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA con promedios respectivos de 0.28 y 1.20. En los promedios de números de hojas no se registraron diferencias significativas entre sí (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Efecto de las seis variantes de medios de cultivo durante el segundo subcultivo en las variables longitud de la planta, número de brotes y número de hojas en la fase de multiplicación

<b>Variantes de medios MS, (1962)</b>	<b>BAP (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>AIA</b>	<b>Longitud del brote principal (cm)</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Número de hojas</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	2.68 a	0.28 d	2.64 a
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.00</b>	2.10 b	1.80 c	3.04 a
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0.25</b>	1.98 bcd	1.20 cd	3.48 a
<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0.50</b>	1.71 d	2.00 bc	3.16 a
<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0.00</b>	1.70 d	3.28 a	3.16 a
<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0.25</b>	2.08 bc	3.12 ab	3.16 a
<b>7</b>	<b>2</b>	<b>0.50</b>	1.60 d	1.68 c	2.68 a

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para  $p \leq 0.05$ .

### 5.2.1.3. Tercer subcultivo

La longitud del brote principal alcanzó promedios mayores de 2 cm en todas las variantes de medios de cultivo, entre los promedios no se presentaron diferencias estadísticas. Los mayores promedios de brotes axilares se alcanzaron en los medios que se agregaron a las sales MS 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP sin adición de AIA y con adición de 0.50 mg l<sup>-1</sup> de AIA con promedios respectivos de 2.32 y 2.24. Estos promedios de brotación axilar resultaron significativamente superiores a los promedios obtenidos en los medios que contenían las sales MS sin adición de reguladores de crecimiento y con 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0.50 mg l<sup>-1</sup> de AIA. En el promedio de número de hojas no presentaron diferencias significativas entre sí, el rango de producción de hojas fue entre 2.20 y 2.76 (Cuadro 7).

Durante el desarrollo del tercer subcultivo se presentaron ligeras alteraciones de temperatura en el cuarto de crecimiento que posiblemente tuvieron un efecto desfavorable en la fisiología de los tejidos implantados con repercusiones en el crecimiento de los explantes del cuarto subcultivo.

**Cuadro 7.** Efecto de seis variantes de medios de cultivo durante el tercer subcultivo en las variables longitud de la planta, número de brotes y número de hojas en la fase de multiplicación

<b>Medios de variantes MS,(1962)</b>	<b>BAP (mg l-1)</b>	<b>AIA</b>	<b>Longitud del brote principal (cm)</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Número de hojas</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	2.66 a	0.72 b	2.20 a
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.00</b>	2.48 a	1.24 ab	2.40 a
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0.25</b>	2.42 a	1.08 ab	2.76 a
<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0.50</b>	2.32 a	0.60 b	2.48 a
<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0.00</b>	2.52 a	2.32 a	2.40 a
<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0.25</b>	2.82 a	1.84 ab	2.68 a
<b>7</b>	<b>2</b>	<b>0.50</b>	2.50 a	2.24 a	2.60 a

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para  $p \leq 0.05$ .

#### **5.2.1.4. Cuarto subcultivo**

La variable longitud del brote principal se alcanzó promedios mayores a 3 cm en medios de cultivo sin adición de reguladores y con 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP en combinación de 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA con promedios respectivos de 3.40, 3.06 y 3.08 cm, disminuyendo a una concentración definida de BAP (1 ó 2 mg l<sup>-1</sup>) cuando se adiciona paulatinamente 0.50 mg l<sup>-1</sup> de AIA. La mayor brotación axilar se logró en el medio de cultivo con 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.25 con promedio de 1.80, superando significativamente a los obtenidos en medios de cultivo sin reguladores de crecimiento y a los que se les adicionaron 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP sin adición o con la adición de 0.25 ó 0.50 mg l<sup>-1</sup> de AIA. En los medios de cultivo que se les suministró 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP en combinación de 0.25 y 0.50 mg l<sup>-1</sup> de AIA el promedio de número de hojas fue de 2.28, resultando estadísticamente inferior al promedio de 2.76 hojas obtenido en el medio que se adicionaron 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA (Cuadro 8 y figura 5).

**Tabla 8.** Efecto de seis variantes de medios de cultivo durante el cuatro subcultivo sucesivos, en las variables longitud de la planta, número de brotes y número de hojas en la fase de multiplicación

<b>Variantes de medios MS,(1962)</b>	<b>BAP (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>AIA (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Longitud del brote principal (cm)</b>	<b>Número de brotes</b>	<b>Número de hojas</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	3.40 a	0.00 c	2.60 ab
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.00</b>	2.87 a	0.76 bc	2.68 ab
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0.25</b>	2.93 a	0.28 c	2.28 b
<b>4</b>	<b>1</b>	<b>0.50</b>	2.62 a	0.28 c	2.28 b
<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0.00</b>	3.06 a	0.92 abc	2.44 ab
<b>6</b>	<b>2</b>	<b>0.25</b>	3.08 a	1.80 a	2.76 a
<b>7</b>	<b>2</b>	<b>0.50</b>	2.66 a	1.56 ab	2.52 ab

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para  $p \leq 0.05$ .

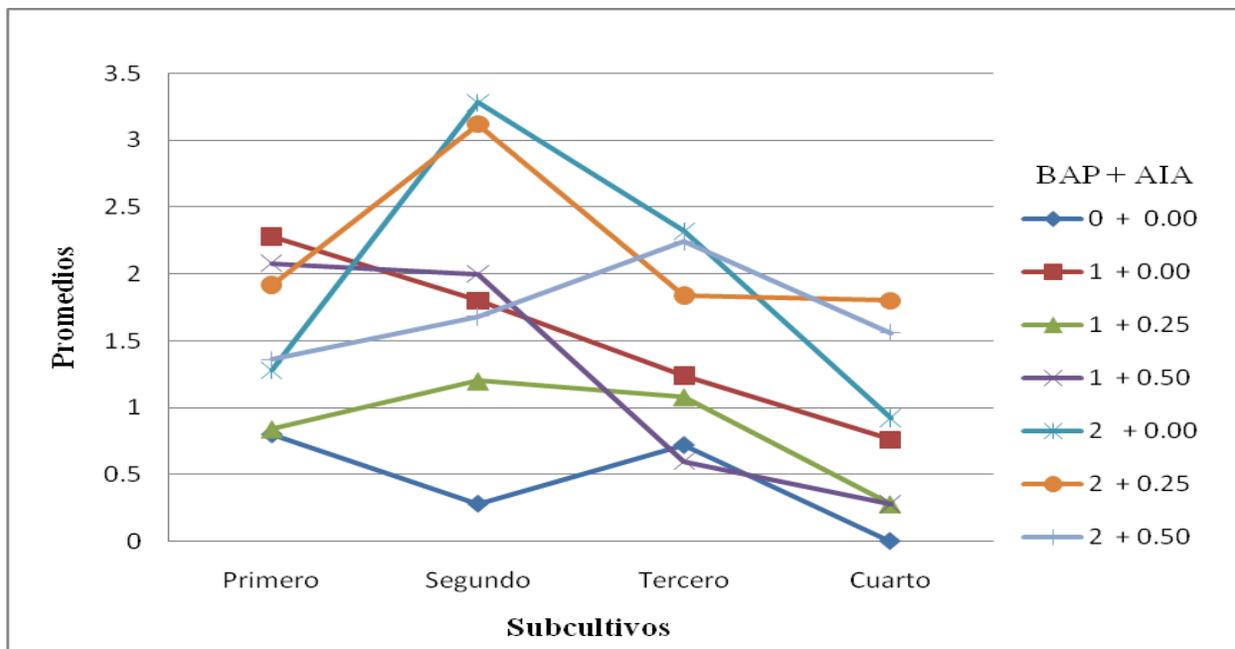
El mayor incremento de número de brotes se observó en el segundo subcultivo en los medios que contenían 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0 y 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA. En la variante de medio de cultivo con 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP + 0.50 mg l<sup>-1</sup> de AIA se produjo un incremento en el número de brotes hasta el tercer subcultivo. En el cuarto subcultivo el número de brotes se redujo en todas las variantes de medios de cultivo. Solamente en el medio con 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP la reducción fue progresiva a partir del primer subcultivo (Figura 5).

Las citoquininas ejercieron gran influencia en la fase de multiplicación en los cuatro subcultivos, los menores promedios de brotación se obtuvieron en los medios de cultivo que no se les suministraron concentraciones AIA y BAP. Resultados similares fueron obtenidos por Caldera y López (2002) en la emisión de brotes axilares en la fase de multiplicación de plátano cultivar Cuerno Enano disminuyó en cada subcultivo en el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento, mientras en los medios que suministraron 3, 4 y 5 mg l<sup>-1</sup> BAP indujeron mayores promedios de brotación.

El comportamiento de la variable número de brotes fue distinto en cada subcultivo, los porcentajes de brotación aumentaron en el segundo subcultivos (3.28 y 3.12) disminuyeron considerablemente en el tercero y cuarto subcultivos. Rodríguez *et al.*, (1987) atribuyen las variaciones en el número de brotes axilares a la procedencia de los brotes dentro de los

subcultivos, los brotes originados de plantas madres producen mayor número y desarrollo de hojas y raíces, mientras los proveniente de hijos producen más brotes con menor número de hojas y raíces.

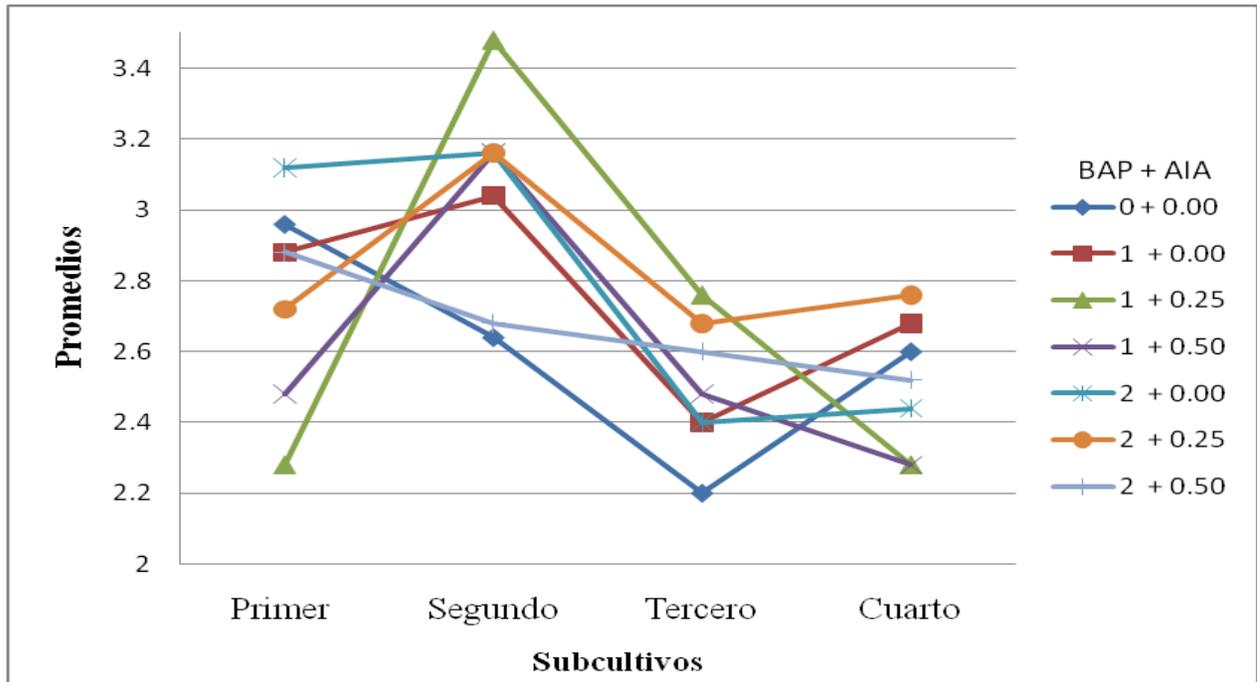
Según Vieitez y Vieitez (1982) a concentraciones de 1 ó 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP se obtiene el mayor número de brotes en material juvenil, no obstante los micro tallos no elongan, produciéndose un arrosetamiento de los explantes por lo que concluyeron que la concentración óptima se encuentra entre 0.1-0.5 mg l<sup>-1</sup> de BAP, y la multiplicación de brotes en medios carentes de BAP es prácticamente nula.



**Figura 5.** Tendencia del número de brotes en plátano Cuerno Gigante en cuatros subcultivos.

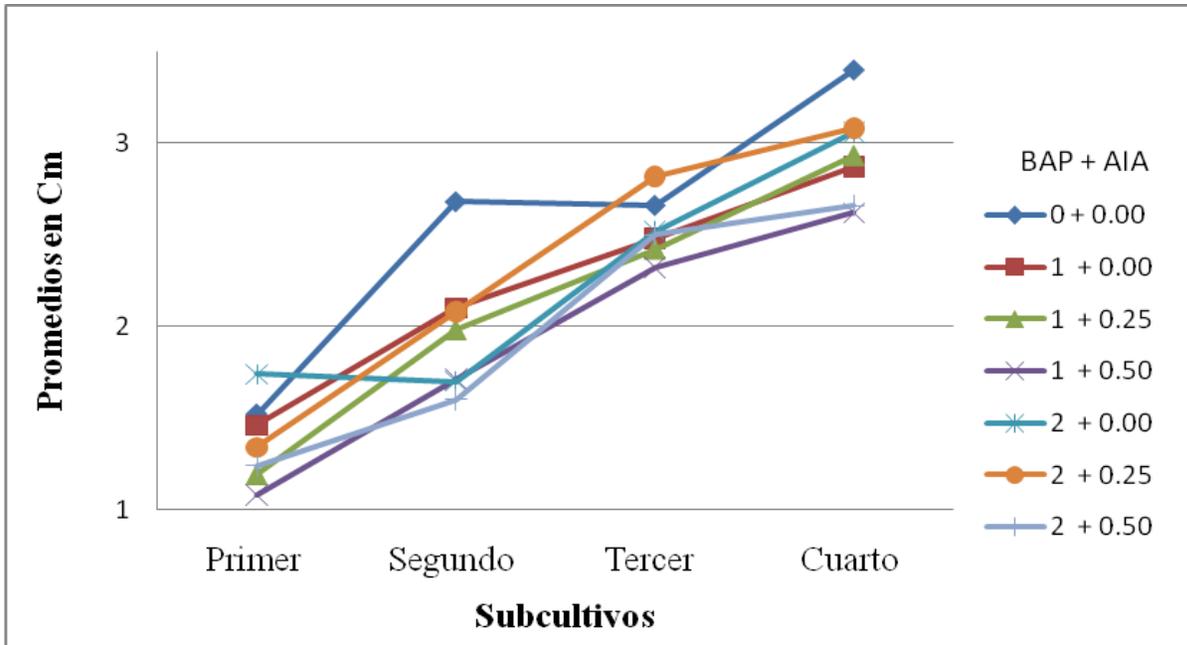
En el segundo subcultivo exceptuando las variantes de medios de cultivo sin reguladores de crecimiento y con mayor adición tanto de BAP y de AIA, se alcanzó el mayor promedio de hojas. Únicamente en la variante de medios de cultivo con 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP + 0.50 mg l<sup>-1</sup> de AIA, disminuyó el número de hojas después del primer subcultivo, mientras que en el medio sin reguladores de crecimiento la tendencia se redujo hasta el tercer subcultivo (Figura 6).

De acuerdo a los resultados no se observó un incremento del número de hojas en los medios con mayor concentración de BAP. Pierik (1990) señala que a concentraciones superiores de citoquininas incrementan significativamente el número de hojas por explante a lo largo del cultivo *in vitro*.



**Figura 6.** Tendencia del número de hojas en plátano Cuerno Gigante en los cuatro subcultivos.

En el segundo subcultivo el medio de cultivo con 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP se observó una leve disminución en el promedio de longitud del pseudotallo. En el cuarto subcultivo en todas las variantes de medios de cultivo se incrementó la longitud del pseudotallo superando a los promedios alcanzados del primero al tercer subcultivo (Figura 7).



**Figura 7.** Tendencia de longitud del pseudotallo del plátano Cuerno Gigante en cuatro subcultivos.

Calderón y Baltierra *et al.* (1993) afirma que la mayor elongación de los micro tallos corresponde al medio que contiene una menor concentración de citoquininas, logrando con esto disminuir la división celular y promover la elongación del tejido debido a la acción de la auxina.



**Figura 8.** Producción de brotes en la fase de multiplicación *in vitro* en plátano cultivar Cuerno Gigante.

### **5.2.2. Efecto del volumen de frasco y el número de plantas por frasco en la fase de multiplicación.**

Una baja densidad de plantas por frasco ocasiona pérdidas de espacio y de medio del cultivo, subutilización de recipientes, mayor demanda de capacidad de esterilización por consiguiente elevación de costos de materiales, energía y mano de obra, entre otros. Cuando la densidad es demasiado alta ocasiona un crecimiento limitado de propágulos e insuficiente proliferación, subcultivos más frecuentes, poco desarrollo de los brotes para transferirlos a la fase de multiplicación (Orellana, 1998).

La mayor longitud del brote principal se presentó en frascos con volumen de 430 ml que contenían 5 plantas con valores de 2.29 cm, resultado superior a los promedios presentados en frascos de 220 ml con 6 y 7 tejidos por frasco con 1.66 y 1.37 cm respectivamente (Cuadro 9).

Los promedios de número de hojas por plantas obtenidos en frascos de 220 ml conteniendo 5 plantas y frascos de 430 ml con 6 plantas fueron superiores al número de hojas obtenidos en frascos con volumen de 220 ml que contenían 6 y 7 plantas con promedios respectivos de 1.47 y 2.23.

La mayor cantidad de brotes se obtuvieron en frascos con volúmenes de 220 y 430 ml con 5 obteniendo promedios de 3.88 y 4.20 respectivamente, que fueron superiores estadísticamente a los alcanzados cuando se sembraron en 6 plantas en los dos volúmenes de frascos (Cuadro 9).

Según Lee (1998) cuando se inoculan mayores densidades de explantes por frascos en un solo frasco se producen mayor cantidades de brotes y raíces, debido a que los explantes difunden sustancias como auxinas y citoquininas en el medio de cultivo.

Los promedios de brotes axilares en este experimento superaron a los obtenidos en el experimento anterior debido posiblemente al efecto del estrés por calor al que estuvieron sometidos los tejidos en el cuarto de crecimiento provocado por desperfectos mecánicos en el sistema de enfriamiento del laboratorio durante el tercer subcultivo y la posible recuperación de

estos de acuerdo a la respuesta de las diferentes variantes que se evaluaron para el estudio de número de explantes por frasco y el volumen de los frascos.

George (1993) reporta que el tamaño y forma del envase puede influir directamente en el crecimiento de los tejidos *in vitro*, en frascos grandes es mejor cuando contiene muchos brotes los cuales ayudan a mantener una adecuada humedad relativa.

**Cuadro 9.** Efecto del volumen del frascos y número de explantes por frascos en las variables número hojas, brotes y longitud del brote principal en plátano cultivar Cuerno Gigante

Frasco (m l-1)	Número de plantas	Variables		
		Número de brotes axilares	Longitud del brote principal (cm)	Número de hojas
220	5	3.88 a	1.94 ab	3.69 a
	6	2.72 b	1.66 b	1.47 b
	7	3.86 ab	1.37 b	2.23 b
430	5	4.20 a	2.29 a	3.21 ab
	6	2.52 b	1.76 ab	3.40 a
	7	3.69 ab	1.80 ab	2.91 ab

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para  $p \leq 0.05$ .

La brotación axilar resulta importante cuando la micropropagación se hace con el objetivo de producir plantas a escala comercial. En nuestro estudio resultó similar el comportamiento estadístico de los promedios de brotes axilares obtenidos con la siembra de 5 plantas en frascos de 220 y 430 ml, es importante la valoración económica del proceso de producción de plantas *in vitro* que incluye costos de mano de obra, insumos, servicios básicos, transporte, etc. Además se debe evaluar la eficiencia y productividad del proceso como son: capacidad de esterilización del autoclave en dependencia del volumen de los frascos, cumplimiento de la norma de producción diaria por operario, porcentajes de pérdidas por contaminación o mal corte de los tejidos, organización del trabajo en el laboratorio etc. (Suárez, 1998 y Pérez, 1998).

Mediante la ecuación general de la producción propuesta por Aragón (1995) citado por Suárez (1998) afirma que es posible calcular la cantidad de material a obtener en un subcultivo dado, partiendo de la cantidad de material inicial existente y de los coeficientes o promedios de brotación axilar (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Cálculo de producción de plantas proyectada mediante la fórmula propuesta por Aragón (1995)

Volumen del frasco (m l-1)	Número de plantas por frasco	Coefficiente o promedio de brotación	*Producción proyectada	Cantidad de frascos	Cantidad de medios de cultivo (litros)
220	5	3.88 a	19,206.00	3,841.20	57.61
	6	2.72 b	13,464.00	2,244.00	33.66
	7	3.86 ab	19,107.00	2,729.57	40.94
430	5	4.20 a	20,790.00	4,158.00	83.16
	6	2.52 b	12,474.00	2,079.00	41.58
	7	3.69 ab	18,265.50	2,609.35	52.18

\*  $P = MI \times [CM (1 - \% R)]$

%  $R = 0.01$

$MI = 5,000$  plantas

Los promedio de brotación axilar resultaron estadísticamente similares con la siembra de 5 ó 7 plantas en frascos de 220 y 430 ml pero cuando utilizamos 5 plantas por frasco de 220 ml se incrementó la cantidad requerida de frascos y medios de cultivo en un 28.93%, en relación con la siembra de 7 plantas por frasco y con frascos de 430 ml y 5 plantas por frasco se incrementaría la cantidad de frascos y medios en un 37.25% en relación con 7 plantas por frasco (Cuadro 10).

La proyección del número de plantas con frascos de 220 ml con 5 plantas resultó ligeramente inferior comparada cuando se utilizaron frascos de 430 ml con la misma cantidad de 5 plantas por frasco, con frascos de 430 ml se requiere de mayor cantidad de frascos y de medios de cultivo. Además del promedio de brotación axilar, también el volumen del frasco resulta determinante a la hora de evaluar los aspectos económicos que intervienen en el costo de producción de las plantas *in vitro* (Figura 9).



**Figura 9.** Fase de multiplicación del plátano cultivar Cuerno Gigante. Izquierda: frasco con capacidad de 430 ml. Derecha: frasco con capacidad de 220 ml.

### 5.3. Fase de enraizamiento

Es la fase más voluminosa de todo el proceso pues cada brote, esqueje o yema formado durante la fase de multiplicación debe ser cultivada y manipulada *in vitro* para que crezca y desarrolle un tallo con hojas y desarrolle raíces que le permitan la absorción de nutrientes al trasplantarse sobre un sustrato en la fase de aclimatación (Orellana, 1998).

Las variables número de hojas, brotes y raíces no presentaron diferencias significativas en los medios de cultivo de consistencia líquida y semi-sólida.

Los mayores promedios de longitud del pseudotallo fueron obtenidos en medios con  $40 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa en combinación con  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA en ambas consistencias ( $4.30$  y  $3.88 \text{ cm}$ ), similar resultado se encontró en la variante de consistencia semi-sólida que se adiciono únicamente  $30 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa con promedio de  $4.30 \text{ cm}$  que resultaron significativamente superiores a los obtenidos en medios de consistencia semi-sólida y líquida con  $30$  y  $50 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa ambos con  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA;  $40 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA y con solamente  $50 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa. En las variantes de medios de cultivo que los promedios de longitud de pseudotallo resultaron inferiores estadísticamente, fue en los medios que se adicionaron solo sacarosa en

concentraciones de 30 y 40 g l<sup>-1</sup> y 50 g l<sup>-1</sup> de sacarosa de consistencia líquida y en el medio de consistencia semi-sólida con 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA , en el medio que contenía 50 g<sup>-1</sup> de sacarosa con 0.5 y 1 ml<sup>-1</sup> de AIA de consistencia líquida (Cuadro 11).

En la variable número de hojas en el medio de consistencia semi-sólida que contenían 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa se obtuvo un promedio de 2.88, resultó significativamente superior a los promedios que se obtuvieron en los medios de cultivo de consistencia semi-sólida o líquida que contenían solamente 50 g l<sup>-1</sup> de sacarosa con promedios respectivos de 1.12 y 1.64 (Cuadro 11).

En el medio de consistencia líquida con 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA el promedio de brotes axilares (0.64) superó significativamente a los promedios obtenidos en las variantes de medios de que solo contenían 30, 40 y 50 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y con 50 g l<sup>-1</sup> de sacarosa con 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA. En los medios que con 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa con 0.5 y 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA ambos de consistencia semi-sólida no presentaron brotación.

Aunque la presencia de brotes axilares en las plantas fue reducida aún persiste el efecto residual de la citoquinina que se agregó a los medios de cultivo en la fase de multiplicación, este fenómeno es conocido como “habitación” reportado por Orellana (1998). Sauvaire y Galzy (1981) reportan que el efecto residual de las citoquininas es tan grande que se hace necesario transferir los brotes durante dos subcultivos continuos en medios de enraizamiento, lográndo en el primero de ellos una elongación de las vitroplantas y el desarrollo de nuevos brotes que dan lugar a un mayor número de vitroplantas en el siguiente subcultivo.

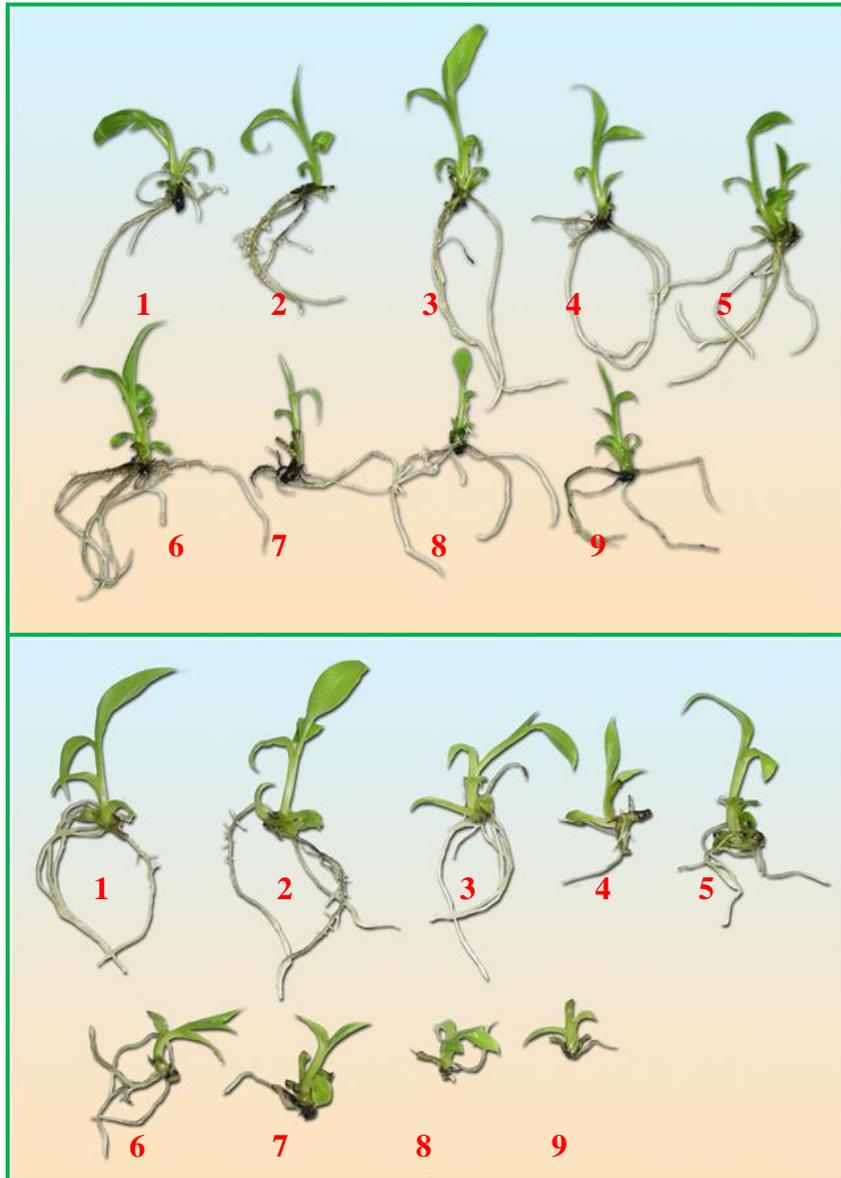
La respuesta de los tejidos a las combinaciones de sacarosa con AIA es causada por el rol de las auxinas en la iniciación y crecimiento de raíces y al efecto sinérgico que se produce cuando se combinan estos compuestos (Tórrez y Vázquez, 1981 citados por Zamora y Jarquín, 2008). El número de raíces en el medio de consistencia semi-sólida con 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa (4.16), resultó superior estadísticamente a los promedios registrados en los medios de consistencia semi-sólida y líquida que contenían 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa en combinación con 0.5 mg l<sup>-1</sup> de AIA y en los tratamiento de 30 y 40 g l<sup>-1</sup> de sacarosa con 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA pero también superó estadísticamente a los promedios de raíces que se presentaron en los medios de consistencia

líquida con 50 g l<sup>-1</sup> de sacarosa y la adición de 0.5 ó 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA, coincidiendo con los resultados obtenidos por Caldera y López (2002) que encontraron el mayor porcentaje de plantas enraizadas en plátano cultivar Cuerno Enano en las variantes de medios que contenían únicamente sacarosa, por ser esta la principal fuente de energía para los tejidos *in vitro* (Cuadro 11 y Figura 10 ).

**Cuadro 11.** Efecto de la AIA, sacarosa y de la consistencia de los medios de cultivo en las variables longitud del pseudotallo, número de hojas, brotes y número de raíces en plátano cultivar Cuerno Gigante

Sales MS (1962)			Variables			
AIA (mg l <sup>-1</sup> )	Sacarosa (g l <sup>-1</sup> )	Consistencia	Longitud de pseudotallo	Número de hojas	Número de brotes	Número de raíces
0.0	30	Semi-sólido	4.03 a	2.88 a	0.20 b	4.16 a
		Líquido	2.95 bc	2.52 abc	0.20 b	2.72 abcd
0.5	30	Semi-sólido	2.59 cde	2.16 abcd	0.00 b	2.20 bcde
		Líquido	2.7 bcd	2.44 abcd	0.24 ab	2.24 bcde
1.0	30	Semi-sólido	2.92 bc	2.28 abcd	0.00 b	2.28 bcde
		Líquido	3.58 ab	2.72 ab	0.64 a	2.56 bcd
0.0	40	Semi-sólido	3.40 abc	2.44 abcd	0.08 b	3.72 ab
		Líquido	2.69 bcd	2.40 abcd	0.04 b	2.64 abcd
0.5	40	Semi-sólido	4.30 a	2.44 abcd	0.28 ab	3.08 abc
		Líquido	3.88 a	2.52 abc	0.28 ab	3.56 ab
1.0	40	Semi-sólido	2.7 bcd	2.24 abcd	0.20 b	2.40 bcd
		Líquido	2.66 bcd	2.16 abcd	0.28 ab	2.20 bcde
0.0	50	Semi-sólido	1.28 f	1.12 e	0.04 b	1.20 de
		Líquido	1.86 def	1.64 de	0.12 b	1.20 de
0.5	50	Semi-sólido	2.69 bcd	2.60 abc	0.28 ab	2.68 abcd
		Líquido	1.68 ef	1.88 cd	0.16 b	1.80 cde
1.0	50	Semi-sólido	3.45 abc	2.48 abc	0.12 b	3.40 ab
		Líquido	1.82 def	1.92 bcd	0.12 b	0.80 e

Letras desiguales dentro de cada columna difieren para  $p \leq 0.05$



**Figura 10.** Plantas en fase de enraizamiento. Arriba: variantes de medios de cultivo de consistencia semi-sólida (1-9). Abajo: variantes de medios de cultivo de consistencia líquida (1-9).

El uso de medio líquido con agitación favorece la rizogénesis, pero disminuye la absorción de las auxinas, las plantas se vitrifican generalmente siendo más difíciles de aclimatar (Hudchitson, 1984).

Según Tórrez y Vázquez (1991) el papel de las auxinas en la iniciación y crecimiento de raíces es bien conocido, recomendándose su empleo en la mayor parte de medios de cultivo en la fase de enraizamiento, siendo el AIA una de las auxinas más usadas. Orellana (1998) reporta que en la micropropagación de plátanos y bananos normalmente se utilizan niveles de AIA de 1-2 mg l<sup>-1</sup> en enraizamiento, aunque Cronauer y Krikorian (1984) encontraron igual respuesta con ANA, AIA y AIB sin añadir citoquininas. Drew y Smith (1990) lograron el enraizamiento en la variedad de bananos New Guinea Cavendish sin la adición de auxina al medio de cultivo, al igual que Sandoval y col (1991) en cultivares genoma AAA, AAB y ABB.

En los medios de cultivo para enraizamiento se recomienda elevar la concentración de sacarosa para lograr un crecimiento vigoroso de raíces. Orellana (1998) y Jiménez (1995) menciona que las vitroplantas procedentes de los medios de cultivos con mayores concentraciones de sacarosa presentan una mayor sobrevivencia en la fase de aclimatación debido a una mejor adaptación para soportar el stress hídrico motivado por las condiciones de mayor presión osmótica donde se desarrollan, unido a una mejor constitución morfológica de la planta.

#### **5.4. Aclimatación**

Esta fase es trascendental para la propagación comercial, pues del resultado de ésta dependerá en gran medida la calidad final de las plantas y la eficiencia total del proceso (Agramonte *et al.*, 1998).

En aclimatación se pretende lograr la sobrevivencia de las plantas al transplante ya que en esta etapa las plantas pasan de un modo de nutrición heterótrofo a ser autótrofas sintetizando compuestos orgánicos y estimulando adaptaciones fisiológicas y morfológicas necesarias para controlar las pérdidas de agua lo que determina susceptibilidad en la fase de aclimatación (Pospisilova *et al.*, 1997).

### 5.4.1 Correlaciones entre las variables longitud del pseudotallo, número de hojas, número y volumen de raíces.

El coeficiente de variación ( $r$ ) es uno de los indicadores más utilizados para medir la intensidad de relación entre dos variables que según su dirección se dividen en directas (positivas o dependientes) e inversas (negativas o independiente) (Pedroza, 1993). Este puede tener un valor de 0 a 1 el signo es indicador de dirección cuanto más cerca este el valor de 1, mayor es la dependencia de correlación entre los dos índices (Ivanov, 1977 citado por García, 2006).

El número de raíces tuvo correlación significativa y positiva con las variables longitud del pseudotallo y volumen de raíces con valores respectivos de  $r = 0.442$  y  $0.780$ . También hubo correlación positiva y significativa entre número de hojas y longitud del pseudotallo con coeficiente de correlación  $r = 0.714$ . No se observó correlación entre volumen de raíces con longitud de pseudotallo y número de hojas (Cuadro 12).

**Cuadro 12** Análisis de correlación de Pearson ( $r$ ) entre las variables número de hojas, volumen de raíces, número de raíces y longitud del pseudotallo

Variables	Longitud del pseudotallo		Número de hojas		Volumen de raíces	
	$r^*$	$P < 0.05$	$r^*$	$P < 0.05$	$r^*$	$P < 0.05$
<b>Número de raíces</b>	0.442 **	0.014	0.280	0.134	0.780**	0.000
<b>Volumen de raíces</b>	0.285	0.127	0.249	0.184		
<b>Número de hojas</b>	0.714 **	0.000				
<b>Media</b>	13.30		6.0			

\*=  $r$  coeficiente de correlación

\*\*= correlación significativa ( $p \leq 0.05$ )

En esta fase las plantas presentaron buenas condiciones morfológicas y fisiológicas, consideramos que los resultados obtenidos mediante el coeficiente de correlación entre las variables evaluadas tiene el propósito conocer la tendencia del crecimiento de las plantas en el futuro, resultando de mucha importancia para el estudio de factores como el tipo de sustrato,

fertilización, etc. Sí obtenemos plantas del Plátano cultivar Cuerno Gigante con promedios de 13.74 cm de longitud del pseudotallo y 6 hojas, podemos esperar que estas plantas presenten un buen número y volumen de raíces sin necesidad de extraerlas del sustrato (Cuadro 12, y Figura 11).

La longitud del pseudotallo está directamente correlacionada con el número de hojas, que resulta importante cuando se aclimatan grandes cantidades de plantas con alta densidad. Si los promedios de longitud del pseudotallo superan los 13.74 cm y el número de hojas es inferior al promedio de 6 hojas por planta, no existiría correlación entre sí. La mayor longitud de plantas puede ser ocasionada por el ahilamiento que se produce cuando existe alta densidad entre plantas en los canteros de reproducción, debido al factor ambiental limitante que es la luz de intensidad baja que tiene cubierta la estructura de aclimatación con tela saran, por tanto se deben hacer los ajustes necesarios para mejorar la calidad de las plantas.

En base a estos resultados consideramos que en el cultivo de plátano es necesario incorporar al análisis de correlación otras variables como el diámetro del pseudotallo y área foliar, de manera que contribuyan a mejorar el conocimiento de la morfología y fisiología de las plantas aclimatadas.

## VI- CONCLUSIONES

En la fase de establecimiento de plátano cultivar Cuerno Gigante los ápices caulinares segregaron fenoles en las diferentes variantes de medios de cultivos influidos principalmente de los factores: procedencia del explante y genotipo utilizado. Los promedios de formación de plantas (5-20%) se localizaron en tratamientos suplidos por BAP en combinación de 0.5 y 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA.

En la fase de multiplicación en los medios de cultivos con adiciones de 1 y 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP se produjeron los mayores promedios de brotación axilar durante los cuatro subcultivos, pero fue en el segundo subcultivo donde se registraron los mayores promedios (3.28 y 3.12) en los medios de cultivo con 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP solo o en combinación de 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA.

La utilización de cinco plantas por frasco estimuló los mayores promedios de brotación axilar (3.88 y 4.20), longitud de brotes y número de hojas en frascos con volúmenes de 220 y 430 ml. La menor brotación axilar se registró cuando se colocaron 6 plantas por frasco independientemente del tamaño del frasco. Con 7 plantas por frasco disminuyó en 28.93% la cantidad de frascos y medios de cultivo requeridos en comparación con la utilización de 5 plantas.

En la fase de enraizamiento la mejor producción de raíces se presentó en el medio de cultivo de consistencia semi-sólida conteniendo únicamente 30 g l<sup>-1</sup> de sacarosa con un promedio de 4.16 raíces, superando significativamente a los obtenidos en medios que contenían 50 g l<sup>-1</sup> de sacarosa.

En la fase de aclimatación el número de raíces tuvo correlación significativa y positiva con longitud del pseudotallo y volumen de raíces con valores respectivos de  $r= 0.442$  y  $0.780$ , además hubo correlación positiva y significativa entre número de hojas y longitud del pseudotallo con valor de  $r= 0.714$ .

## VII- RECOMENDACIONES

Para reducir la oxidación fenólica en la fase de establecimiento de ápices caulinares del cultivar de plátano Cuerno Gigante, es necesario experimentar con distintos productos antioxidantes en diferentes concentraciones en medios de cultivo y alternativas del manejo como la siembra de renuevos en reproducción, para posteriormente extraer los ápices caulinares.

Estudiar el comportamiento agronómico de las plantas *in vitro* en condiciones de campo evaluando su manejo, fisiología y la estabilidad genética del plátano cultivar Cuerno Gigante.

Incorporar el análisis de correlación de otras variables como las de rendimiento (diámetro del pseudotallo, área foliar, peso del racimo, número de dedos, etc; en plantaciones establecidas con el objetivo de conocer el comportamiento y crecimiento de las plantas *in vitro* en manera las mejores plantas que proveerán de explantes a la micropropagación.

## VIII- REVISIÓN DE LITERATURA

**Agramonte, D.; Jiménez, F. y Dita, R.** 1998. Aclimatización. En. Propagación y Mejora Genética de plantas por biotecnología. (Ed) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba. Pp 193-206.

**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 p.

**Aguilar, M. y Reyes, G.** 2004. Métodos alternativos de Propagación de semilla agámica de Plátano, p 5. Universidad Nacional Agraria. Guía técnica 1.

**Aguilar, M. y Reyes, C.** 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 Nicaragüense, Universidad Nacional Agraria. (FAGRO). (Managua – Nicaragua) N°1. 64 p.

**Alemán, F; Somarriba, C. y Munguía R.** 2004. Diagnóstico fitosanitario y económico de la producción de musáceas en el departamento de Rivas. Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.

**Alvarado, Y.** 1998. Contaminación microbiana en el Cultivo *in vitro* de plantas. En. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba. Pp 81 – 904.

**Aragón, N.** 1995. Ecuación de producción para Biofábrica. Informe final de investigación. Universidad de las Villas, Santa Clara, Cuba.

**Caldera, C. L. y López, R. J.** 2002. Mejoramiento de la eficiencia de propagación *in vitro* de plátano (*musa* AAB cultivar enano). (Tesis) Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. Pp. 1- 13.

**CATIE**, 2005. Estudio del potencial antagonista de hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones de banano en Costa Rica. Disponible en internet:

[http://musalit.inibap.org/pdf/IN070511\\_es.pdf](http://musalit.inibap.org/pdf/IN070511_es.pdf)

**Cronauer, S. S. y Krikorian A. D.** 1984. In: Handbook of plant cell culture. Vol. 2: 327-348.

- Champion, J.** 1978. El plátano. Editorial BLUME. Barcelona España. 247 p.
- Damásco, O. P.** 1984. *In vitro* culture of *Musa* spp. Cultivar Saba (BB). Phil. Agric.
- Dottin, M. P.** 2000. Propagación *in vitro* de la malanga (*Xanthosoma sagittifolium* (L) Schott). Tesis de Doctorado. Universidad Central de Las Villas, Cuba. 119 p.
- FAO,** 2000. (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Anuario de producción. Vol 54.
- García, M. A.** 2006. Comportamiento agronómico con las prácticas de deshije y sin deshije en vitroplantas de plátano (*Musa* spp) cultivar cuerno, genotipo (AAB) y el estudio de correlaciones lineales entre caracteres para facilitar la selección temprana de plantas con buen rendimiento (Tesis) Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. Pp. 22.
- George, E.** 1993. Plant propagation by tissue culture part 1. The technology. (Ed) Exegetics Limited. Edington, Wilts. England. Pp 9 – 65.
- George, E. F. y Sherrington, J. P.** 1984. Plant propagation by tissue culture. Handbook and directory of commercial laboratories Exegetics Limited, Edington, Wilts, England. Pp 118 -210.
- Hu, C. V. y Wang, J. P.** 1983. Meristem, shoot tip and bud culture. En: Handbook of Plant Cell Culture. Evans, D.; Ammirato P.V and Llamea, Y. (eds). MacMillan Publishing, New York. Vol.1: 177- 227.
- IICA,** 2004. Cadena Agroindustrial El Plátano. (online) 10 de diciembre del 2008. Disponible en internet: [www.iica.int.ni/Estudios\\_PDF/Cadena\\_Platano.pdf](http://www.iica.int.ni/Estudios_PDF/Cadena_Platano.pdf).
- Jiménez, G. E.** 1998. Cultivo de ápices y meristemas. En: Propagación y Mejora Genética de plantas por biotecnología (e d) Pérez Ponce. Santa Clara, Cuba. Pp 45-46.
- Jiménez, G. E.** 1997. Conferencias del Curso Internacional de Propagación *in vitro* de especies vegetales. IBP, Septiembre 11-19 de 1997. Santa Clara, Cuba. Pp 127-134.

- Jiménez, G. E.** 1995. Propagación *in vitro* de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido). Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de las Villas, Cuba. 99 p.
- Juárez, D. A. y Zamora, A. M.** 2008. Micropropagación de piña *Ananas comosus* (L.) (Merr) cultivar MD2. (Tesis). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua. 39 p.
- Leifert, C.; Waites, W. N. y morris, C. E.** 1994. Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field grown plant: reason for contamination problems *in vitro*. *Critical reviews in plants sciences*, 13: 139-183.
- MAGFOR.** 1990. Evaluación del ciclo agrícola 1990 y Proyecciones. Managua.
- Martinez, S. J.** 1995. Perfeccionamiento de la tecnología para la micropropagación. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología de las plantas. Santa Clara, Cuba. 65 p.
- Marcillas, M.** 2001. Propagación masiva *in situ* del híbrido de plátano FHIA-20 utilizando bencilaminopurina. *INFOMUSA*, 3-4 p.
- MIFIC,** 2007. Comercio Intraregional, Managua,
- Murashige, T. y Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* Pp 473-497.
- Mroginski, L. A. y Roca, W. M.** 1991. Cultivos de tejidos vegetales en la agricultura. En: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. (Ed) Centro de internacional de agricultura tropical (CIAT). Cali, Colombia. 22 pp.
- Orellana, P.** 1994. Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis doctoral. Universidad Central de las Villas, Santa Clara, Cuba. 96 p.
- Pedroza, H.** 1993. Fundamentos de experimentación agrícola. Editora de Arte. Managua, Nicaragua.
- Pérez, J N.** 1998. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba. Pp. 83 – 295.

- Pérez Ponce, J.N.** 1998. Propagación vía organogénesis. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. (Ed.). Santa Clara, Cuba. IBP. Pp. 162-163.
- Pierik, R. L.** 1990. Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. (ed.) Mundi-Prensa.
- Preece, J. E. y Sutter, E. G.** 1991. Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field.
- Ramos, L. y Canchignia, F.** 2004. Micropropagación de plátano variedad Barragante, 1 p.
- Rodríguez, M; Lorenzo, J. R.; y García S.** 1987. Significance of physiological history in the vegetative propagation of banana shoots tips. Acta 212: 61-68 pp.
- Sandoval, J. A.** 2001. Biotecnología aplicada para la micropropagación de banano y plátano (Musa AAA, AAB). Ed. Loria, M. San José, CR. Pp 3-7.
- Sandoval J; Brenes G; Pérez L.** 1991. Micropropagación de plátano y banano en el CATIE. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 186 p. (Serie Técnica. Informe técnico 22).
- Sandoval, J. A** 1985. Determinación del tamaño del explante para la propagación *in vitro* en medio de cultivo de *Musa* spp. Turrialba. Universidad de Costa Rica. Tesis de Licenciatura en Agronomía. 50 p.
- Sauvarie, D. y Galzy R.,** 1981. Micropropagation de la canne a sucre par bouturage *in vitro*. Action d'une auxine et d'une cytokinine. L'agronomie tropicale 36(1): 63-69 pp.
- Simmonds, W.** 1962. The evolution of bananas. Longmans, London. 170 p.
- Smith, M. K. y Drew, R. A.** 1990. Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. Aust. Journal Plant Physiol.
- Suárez, M.** 1998. Organización de la producción Eni. Propagación y mejora genética de plantas por Biotecnología. (Ed). Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba. Pp. 259-281.
- Vaugh, K. C y Duck, S. O.** 1994. Functions of polyphenol oxidase in higher plants. Physiol plant, 60: 106-112 pp.

**Zamora, A.; C, Damásco.; E. Estaño.; R. Barba y L. Pataña.** 1989. Note: Growth and yield of Micropropagated and sucker-derived banana plants 61 (*Musa* spp. Cultivar. Lakatan, Bongulan and Saba). De Philippine Agriculturist 72 (4): 458-465 pp.