



Por un desarrollo Agrario  
y Integral Sostenible

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

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**Micropropagación tradicional y en Biorreactores Económicos de  
Inmersión Temporal del cultivar de plátano (*Musa spp.*) CEMSA**

$\frac{3}{4}$

**AUTORES**

**Br. Santos Enyelbert Castro Sobalvarro**  
**Br. Eduardo Enrique Maradiaga Sarantes**

**ASESORES**

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

**Managua, Nicaragua**

**Noviembre, 2015**



Por un desarrollo Agrario  
y Integral Sostenible

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

**TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**Presentado al honorable tribunal examinador como requisito final  
para optar al grado de Ingeniero Agrónomo**

**Micropropagación tradicional y en Biorreactores Económicos de  
Inmersión Temporal del cultivar de plátano (*Musa spp.*) CEMSA**

$\frac{3}{4}$

**AUTORES**

**Br. Santos Enyelbert Castro Sobalvarro**  
**Br. Eduardo Enrique Maradiaga Sarantes**

**ASESORES**

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

**Managua, Nicaragua**

**Noviembre, 2015**

## 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>	1
<b>II- OBJETIVOS</b>	3
<b>III- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	4
4.1.    Localización del experimento	4
4.2.    Esterilización de materiales y equipos	4
4.3.    Fase de establecimiento	4
4.3.1.    Selección del material vegetativo	4
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	6
4.4.1.    Definición del mejor medio de cultivo en consistencia semi-sólida	6
4.4.2.    Efecto del número de brotes axilares por BEIT en el ahijamiento	7
4.5.    Fase de enraizamiento	8
4.6.    Diseño experimental y análisis estadístico	8
4.6.1.    Fase de establecimiento	8
4.6.1.1.    Variables evaluadas	8
4.6.2.    Fase de multiplicación	9
4.6.2.1.    Medio de cultivo en consistencia semi-sólida en tres subcultivos sucesivos	9
4.6.2.1.1.    Variables evaluadas	9
4.6.2.2.    Efecto del número de brotes axilares por BEIT	9
4.6.2.2.1    Variables evaluadas	9

4.6.3.	Fase de enraizamiento	9
4.6.3.1.	Variables evaluadas	10
<b>IV-</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>11</b>
5.1.	Fase de establecimiento	11
5.1.1	Fenolización de ápices caulinares	11
5.1.2	Ápices en crecimiento	13
5.1.3	Contaminación	14
5.2.	Fase de multiplicación	15
5.2.1.	Efecto de los medios de cultivos en la producción de brotes axilares, número de hojas y longitud del brote en tres subcultivos	15
5.2.1.1.	Primer subcultivo	15
5.2.1.2.	Segundo subcultivo	16
5.2.1.3.	Tercer subcultivo	17
5.2.2.	Número de brotes axilares por BEIT	22
5.3.	Fase de enraizamiento en BEIT	24
<b>V-</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>27</b>
<b>VI-</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	<b>28</b>
<b>VII-</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>30</b>

## DEDICATORIA

Doy gracias a Dios por haberme ayudado a cumplir una de mis metas.

A mi madre **Lic. Maritzol Sobalvarro Rivera** y a mi abuelita **Santos Sandra Rivera** que me han ayudado y apoyado incondicionalmente en todo el transcurso de mi vida con sus consejos y esfuerzos he salido adelante.

A mi padre **Ing. Francisco Alberto Blandón** por darme su gran apoyo y haberme ayudado mucho a superarme y crecer como persona.

A mis hermanas **Jaqueline, Katherine y Gema Sobalvarro** debido a que fueron personas extraordinarias que me animaron y estuvieron conmigo en las buenas y las malas

A mis **tíos, tías y primos** por haberme apoyado incondicionalmente brindándome un buen ejemplo digno de seguir.

A mis compañeros y amigos que me han ayudado mucho.

**Br. Santos Enyelbert Castro Sobalvarro**

## DEDICATORIA

Infinitas gracias a **Jehová Todopoderoso** por darme la vida y la oportunidad de alcanzar uno más de mis objetivos.

A mis padres **Álvaro Emilio Maradiaga Hurtado** y **Juana Sarantes López** por estar en todo momento a mi lado brindándome el apoyo incondicional y la ayuda necesaria para salir adelante dándome fortaleza para poder alcanzar mis logros, también a mis hermanos que me han ayudado en gran manera para alcanzar mis metas. Infinitas gracias a todos por su sacrificio y esfuerzo.

A la Señora **Cecilia Delgadillo** por haberme instado y ayudado mucho incondicionalmente, a la **Lic. Luvy Villalobos** por todos sus consejos y su gran apoyo.

A todos mis compañeros y amigos con quienes he tenido el agrado de compartir.

**Br. Eduardo Enrique Maradiaga Sarantes**

## **AGRADECIMIENTO**

A **Jehová Dios Todopoderoso** por guiarnos y ayudarnos en nuestra vida, por darnos la salud y el bienestar a nosotros y a nuestras familias.

A todos los docentes que han contribuido en toda nuestra formación académica y desarrollo educativo.

A nuestros asesores **MSc. Marbell Danilo Aguilar Maradiaga** e **Ing. Roxana Yadira Cruz Cardona** por compartir con nosotros y por su apoyo constante en nuestra tesis brindándonos sus conocimientos, experiencias, y sobretodo su confianza que de tal forma han facilitado la culminación de nuestros estudios. Les expresamos nuestra infinita gratitud.

Al **MSc. Álvaro Benavides** por haber brindado su gran apoyo en la realización del análisis estadístico de nuestro estudio.

Al **PhD. Guillermo Reyes** por el apoyo que nos brindó.

**Br. Santos Enyelbert Castro Sobalvarro**

**Br. Eduardo Enrique Maradiaga Sarantes**

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1.	Variantes del medio de cultivo en la fase de establecimiento <i>in vitro</i> de ápices de plátano ( <i>Musa</i> AAB.) cv CEMSA ¾.	6
2.	Variantes de medio de cultivo en la fase de multiplicación <i>in vitro</i> de plátano cv CEMSA ¾.	7
3.	Variantes de medios de cultivo en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> de plátano cv CEMSA ¾.	8
4.	Variantes de medios de cultivo en el grado de fenolización, porcentaje de contaminación y ápices en crecimiento a los 30 días de establecidos.	12
5.	Siete variantes de medios de cultivo durante el primer subcultivo en el número de brotes, hojas y longitud del pseudotallo en la fase de multiplicación.	16
6.	Siete variantes de medios de cultivo durante el segundo subcultivo en el número de brotes, hojas y longitud del pseudotallo en la fase de multiplicación.	17
7.	Siete variantes de medios de cultivo durante el tercer subcultivo en el número de brotes, hojas y longitud del pseudotallo en la fase de multiplicación.	18
8.	Efecto del volumen del BEIT en el número hojas, brotes y longitud del pseudotallo en plátano cv CEMSA ¾	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA</b>		<b>PÁGINA</b>
1.	Rebrotes del corno madre, reducción y dimensión de ápice caulinar del plátano cv CEMSA ¾.	5
2.	Desinfección, corte y establecimiento de ápices caulinares de plátano cv CEMSA ¾. .	5
3.	BEIT de 1000 ml con plantas de Plátano cv CEMSA ¾ en la fase de reproducción	7
4.	Niveles de Fenolización del Plátano cv CEMSA ¾ en la fase de Establecimiento	11
5.	Ápice en crecimiento de plátano cv CEMSA ¾.	13
6.	Promedios de brotes axilares producidos en siete variantes de medios de cultivo y tres subcultivos sucesivos en el cv CEMSA ¾.	20
7.	Número de hojas producidas en siete variantes de medios de cultivo y tres subcultivos sucesivos en el cv CEMSA ¾.	21
8.	Medias de longitud de pseudotallo obtenidas en siete variantes de medios de cultivo y tres subcultivos sucesivos en el cv CEMSA ¾.	22
9.	Medias de las variables, longitud de pseudotallo, número de hojas y raíces en la fase de enraizamiento del plátano cv CEMSA ¾.	25
10.	Plantas de plátano cv CEMSA ¾ en fase de enraizamiento en las variantes de medios de cultivo (M <sub>1</sub> , M <sub>2</sub> , M <sub>3</sub> , M <sub>4</sub> y M <sub>5</sub> ).	26

## RESUMEN

El estudio se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Universidad Nacional Agraria de marzo 2014 - junio de 2015. Se evaluó el efecto del AIA y del BAP en el establecimiento del plátano cv CEMSA ¾, la respuesta de los tejidos a los medios de cultivo de consistencia semi-sólida en tres subcultivos sucesivos en la multiplicación y la producción de brotes axilares por efecto de la siembra de 30, 35, 40, 45 y 50 tejidos por BEIT. Se evaluó el efecto del AIA y de los BEIT en la inducción de raíces. Los datos de establecimiento se analizaron en tablas porcentuales, en las fases de multiplicación y enraizamiento el diseño bloques completos al azar y se determinaron los mejores tratamientos mediante el comportamiento estadístico de las medias mediante el análisis de Duncan y Waller. Los ápices respondieron favorablemente cuando se adicionaron concentraciones entre 0.50 y 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA o el suministro de 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP, la producción de fenoles se relacionó con el genotipo. Las mayores medias de brotación axilar en el tercer subcultivo cuando se agregó 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP con o sin adición de AIA. Con densidades de siembra de 30, 40, 45 y 50 yemas axilares por BEIT no se registraron diferencias significativas en el número de brotes axilares. La longitud del pseudotallo, el número de hojas y el número de raíces respondieron favorablemente a las sales de MS enriquecidas con concentraciones de 0.25, 0.50 ó 0.75 mg l<sup>-1</sup> de AIA.

**Palabras claves:** MS, Plátano, Micropropagación, BEIT, AIA, BAP.

## ABSTRACT

The study was conducted in the laboratory of tissue culture of the National Agrarian University in march 2014 - june 2015. Were assessed the effect of the AIA and BAP in the establishment of the banana cv CEMSA 3/4, the tissue response to the culture media of semi-solid consistency in three successive subcultures on the multiplication and the production of axillary buds by effect of the planting of 30, 35, 40, 45 and 50 fabrics by BEIT. Were assessed the effect of the AIA and the BEIT in the induction of roots. Establishment data were analyzed in percentage tables, in phases of multiplication and rooting design complete block random and determined the best treatments by the statistical behavior of the tights through the analysis of Duncan and Waller. Apices responded favorably when they were added concentrations between 0.50 and 1 mg l<sup>-1</sup> of AIA or supply of 1 mg l<sup>-1</sup> of BAP, phenol production related to the genotype. Major averages axillary bud in the third subculture when it was added 3 mg l<sup>-1</sup> mg l<sup>-1</sup> of BAP with or without addition of AIA. With stocking densities of 30, 40, 45 and 50 axillary buds by BEIT there were no significant differences in the number of axillary shoots. The length of the pseudostem, leaf number and number of roots responded favorably to MS salts enriched with concentrations of 0.25, 0.50 or 0.75 mg l<sup>-1</sup> of AIA.

**Key words:** MS, Plantain, Micropropagation, BEIT, AIA, 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). FAO (2000) plantea que 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.

Según CENAGRO (2011) el cultivo de las musáceas en Nicaragua se calcula en unas 54,075.9 ha. Del total de hectáreas a nivel nacional 17.53 % se cultiva en el departamento de Rivas (9,484.3 ha), 14,76 % en la RAAS (8,163.8 ha) y 14,31 % en la RAAN (7,917.9 ha). Según Masís, Macotto, 2009; citado por MIFIC, 2012, Nicaragua realiza la mayor parte de las exportaciones a El Salvador, Honduras y Costa Rica y solo una mínima parte es exportado a los Estados Unidos.

Los cultivadores de plátano establecen el cultivo con semilla de origen y 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 mezclas de plantas de diferentes calidades y además sean fuente de diseminación de plagas y enfermedades transmitidas a través del material de siembra como el picudo negro del plátano (*Cosmopolites sordidus* Germ) y el nemátodo (*Rhadopholus similis*) (Aguilar et al., 2004).

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; citado por Chavarría y López, 2010).

Aguilar (2014) aduce que aunque los beneficios por el uso de plantas obtenidas por la técnica de micropropagación superan a los métodos tradicionales de propagación, la micropropagación tradicional tiene una serie de limitantes en relación a la producción de plantas en biorreactores entre las que se destacan: 1) los procesos de producción demandan de mucho trabajo, 2) el alto costo del agar producto para gelificar los medios de cultivo, 3) el requerimiento de gran cantidad de cristalería, 4) el establecimiento y mantenimiento de grandes superficies de trabajo y para el almacenamiento de plantas

Las ventajas de los sistemas de inmersión en medio líquido sobre la micropropagación tradicional parecen ser el resultado de las condiciones físicas creadas en el recipiente de cultivo como son: aporte más eficiente de los elementos nutritivos, mínima interrupción del intercambio de gases entre el explante o embrión y la atmósfera, no hay acumulación excesiva de gases nocivos para los tejidos y la dispersión de los tejidos por efecto del flujo de aire en recipiente (Pérez *et al.*, 1998).

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

El empleo de los Biorreactores Económicos de Inmersión Temporal (BEIT) desarrollado en la Universidad Nacional Agraria (UNA) para la producción de masiva de plantas *in vitro* de diferentes especies, demuestra que es posible reducir el tiempo y el costo de producción, y contribuye a pequeña escala de producción a la mejora de la calidad genética y fitosanitaria de los cultivos en diferentes regiones de Nicaragua

En el presente estudio se empleó el sistema de micropropagación tradicional y BEIT. Se evaluó el efecto de dos reguladores de crecimiento (AIA y 6-BAP) para la micropropagación de plátano cv CEMSA ¾ en las fases de establecimiento, multiplicación y enraizamiento con el objetivo de definir las concentraciones adecuadas de los reguladores de crecimiento que permitieron obtener un mayor coeficiente de multiplicación.

## **II. OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar el efecto de diferentes factores en el coeficiente de multiplicación en condiciones de micropropagación tradicional y de BEIT en el plátano cv CEMSA ¾.

### **Específicos**

Determinar las mejores concentraciones de los reguladores de crecimiento en las diferentes fases de la micropropagación tradicional y BEIT.

Definir el número de brotes axilares que permiten mayor coeficiente de multiplicación en BEIT.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización del experimento

La producción *in vitro* de plantas de plátano cv CEMSA ¾ 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 período comprendido marzo 2014-junio 2015.

#### 3.2. Esterilización de materiales y equipos

En el lavado 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 autoclave a 120 °C a una atmósfera de presión durante 15 minutos; los beaker, platos petri, las pinzas y las hojas con los escalpelos se esterilizaron en un horno a temperaturas de 170 °C durante 1 hora. Antes de efectuar la siembra de los tejidos en los tubos de ensayo, se procedió a desinfectar la cámara de flujo laminar con alcohol al 90%, posteriormente se expuso a luz ultravioleta durante 30 minutos. A las diferentes variantes de medios de cultivo se les adicionaron 2.5 mg l<sup>-1</sup> del agente gelificante Phytigel, como sustancia antioxidante se agregaron 100 mg l<sup>-1</sup> de ácido cítrico y como fuente de carbono se suministraron 30 mg l<sup>-1</sup> de sacarosa.

#### 3.3. Fase de establecimiento

##### 3.3.1. Selección del material vegetativo

El material vegetativo se obtuvo de plantas seleccionadas con producción de 50 dedos por racimo y que presentaron buenas condiciones fitosanitarias, los cormos se extrajeron de la finca del Sr. Gilberto Rodríguez Espinoza, ubicada en el municipio Tola departamento de Rivas. Posteriormente se cortaron segmentos de los cormos madres conteniendo un ápice como se describe en la metodología de multiplicación de plátano a través de la Técnica de Reproducción Acelerada (TRAS) descrita por Aguilar y Reyes (2004).

Los segmentos de corno se sembraron en canteros usando como sustrato arena construcción previamente desinfectada con agua hervida.

### 3.3.2. Preparación y desinfección del material vegetativo

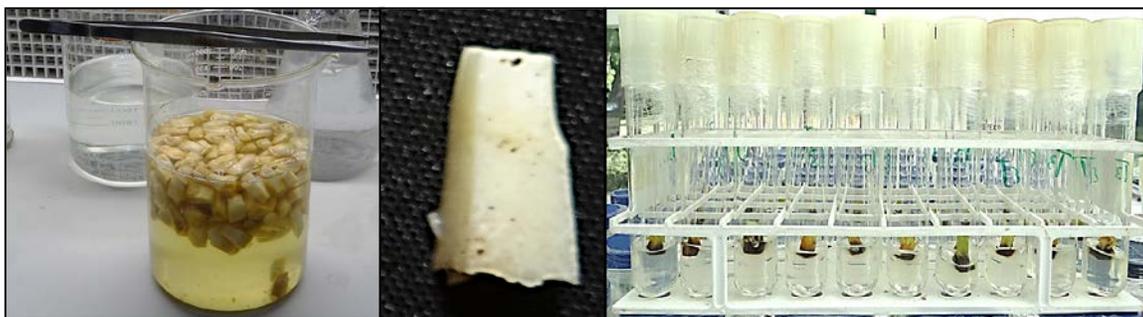
Cuando los pseudotallos que brotaron de las yemas axilares alcanzaron longitudes de entre 15 y 25 cm, se procedió a separarlos a partir de la base con cuchillo, procurando no causar daños en la sección de tejidos donde se encuentran los ápices caulinares. Posteriormente los explantes se redujeron a un tamaño aproximado entre los 4 y 5 cm de longitud y de 2 a 3 cm de ancho (Figura 1).



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

Los explantes se colocaron en un recipiente que se cubrió con malla plástica para asegurar que permanecieran dentro y para desprender los residuos de polvo y otras impurezas, además de lavarlos con agua del grifo, se agregaron cuatro gotas de surfactante tween 20 proceso que duró 20 minutos. Después los explantes se llevaron a la cámara de flujo laminar para realizarles la primera desinfección con  $\text{NaClO}_3$  al 2% durante 5 minutos.

Finalizada la desinfección de los tejidos, se efectuaron tres enjuagues sucesivos con agua estéril para eliminar los residuos de cloro y finalmente sobre platos Petri se redujeron los ápices caulinares hasta 0.5 cm.



**Figura 2.** Izquierda: desinfección de ápices caulinares. Centro: ápices de 0.5 cm. Derecha: ápices establecidos en tubos de ensayo.

### 3.3.3. Siembra del material vegetativo

Los explantes se sembraron individualmente en tubos de ensayo de 15 cm de longitud y 1.5 cm de diámetro, se adicionaron a cada tubo de 10 ml de medio de cultivo de consistencia semi-sólida, posterior a la siembra de los explantes se trasladaron al cuarto de crecimiento bajo condiciones de  $27 \pm 3$  °C y exposición a luz natural. A los 30 días después del establecimiento de los ápices caulinares, se procedió a efectuar la evaluación.

### 3.3.4. Medios de cultivo

En la fase de establecimiento se evaluó el efecto de seis variantes de medios de cultivo con diferentes concentraciones de las hormonas de AIA y BAP en el crecimiento y formación de plantas, estas variantes de medios de cultivo fueron estudiadas por Caldera y López (2002) en el cultivar de plátano Enano (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Variantes del medio de cultivo en la fase de establecimiento *in vitro* de ápices de plátano (*Musa* AAB) cv CEMSA ¾.

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.

## 3.4. Fase de multiplicación

### 3.4.1. Definición de mejor medio de cultivo de consistencia semi-sólida.

Se definió el mejor medio de cultivo en estado semi-sólido en tres subcultivos sucesivos en base al mejor promedio de brotes axilares producidos por planta y a variables fisiológicas. En el Cuadro 2, se presentan las siete variantes de medio de cultivo.

**Cuadro 2.** Variantes de medio de cultivo en la fase de multiplicación *in vitro* de plátano (*Musa AAB*) cv CEMSA ¾.

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

### 3.4.2. Efecto del número de brotes axilares por BEIT en el ahijamiento

La variante de medio de cultivo que contenía 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0.25 mg l<sup>-1</sup> indujo la mayor brotación axilar del experimento referido en el acápite 4.4.1. Posteriormente con hojas de escalpelos se separaron brotes axilares de las plantas formadas hasta reducir los pseudotallos a una longitud aproximada de 1 cm. En cada uno de los tres BEIT de 1000 ml se sembró 30, 35, 40, 45 y 50 yemas axilares, en la figura 3 se presenta el modelo de BEIT.



**Figura 3.** BEIT de 1000 ml con plantas de Plátano cv CEMSA ¾ en la fase de reproducción.

En este experimento se realizó una inmersión temporal de 3 minutos cada 24 horas.

### 3.5. Fase de enraizamiento

En la fase de multiplicación se estudió el efecto que produce en el crecimiento de las plantas y en la producción de raíces cinco variantes de medios de cultivo que contenían cuatro concentraciones de AIA (0.25, 0.50, 0.75 y 1 mg l<sup>-1</sup>) y el testigo que no se le adicionó AIA. Se sembraron 30 plantas por BEIT y se suministraron 250 ml de medios de cultivo a cada BEIT, se realizó una inmersión temporal de 2 minutos cada 24 horas. En el Cuadro 3 se presentan las variantes de medios de cultivo en la fase de enraizamiento.

**Cuadro 3.** Variantes de medios de cultivo en la fase de enraizamiento *in vitro* de plátano (*Musa AAB*) cv CEMSA ¾.

Variantes del medio MS (1962)	Regulador de crecimiento
	AIA (mg l <sup>-1</sup> )
1	0.0
2	0.25
3	0.50
4	0.75
5	1.0

### 3.6. Diseño experimental y análisis estadístico

#### 3.6.1. Fase de establecimiento

Se estableció un ápice caulinar por tubo de ensayo con 25 ápices por variante de medio de cultivo. Los ápices en crecimiento activo se consideran aquellos que presentaban coloración verde con abultamiento o desprendimiento de primordios de hojas. Para el análisis de los datos no paramétricos se utilizaron tablas porcentuales. La evaluación se realizó a los 30 días después de establecidos.

##### 3.6.1.1. Variables evaluadas

- a. Grado de fenolización (leve, medio y alto)
- b. Porcentaje de contaminación
- c. Ápices en crecimiento
- d. Porcentaje de plantas formadas

### **3.6.2. Fase de multiplicación**

#### **3.6.2.1. Medio de cultivo de consistencia semi-sólida en tres subcultivos sucesivos**

A los datos de las variables evaluadas en los tres subcultivos se les practicó el análisis estadístico correspondiente de forma separada. Cada unidad experimental se constituyó con 25 plantas (cinco frascos) por cada variante de medios de cultivo y en cada frasco se sembraron cinco plantas. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar (BCA) con arreglo unifactorial y cada bloque consistió de 5 frascos.

Para el análisis estadístico 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.

##### **3.6.2.1.1. Variables evaluadas**

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

#### **3.6.2.2. Efecto del número de brotes axilares por BEIT**

Para conocer el efecto del número de plantas por BEIT en el coeficiente de multiplicación, se efectuó un análisis de varianza y la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller  $\alpha = 0.05$  y un diseño de BCA con arreglo unifactorial.

##### **.6.2.2.1. Variables evaluadas**

Las variables evaluadas fueron similares a las definidas para el experimento del acápite 4.6.2.1.1.

### **3.6.3. Fase de enraizamiento**

Para el estudio se utilizaron BEIT de 1000 ml y se adicionaron 250 ml de medio de cultivo en cada BEIT por cada una de las cinco variantes de medio de cultivo. En el experimento se utilizó un diseño de BCA con arreglo unifactorial, donde cada bloque lo conformaron tres BEIT conteniendo cada uno 30 brotes axilares. Las evaluaciones de las variables se realizaron a los 30

días después de la siembra. Se realizó un ANDEVA y se determinó la mejor variante de medio de cultivo mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan y Waller con  $\alpha=0.05$

#### **3.6.3.1. 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

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

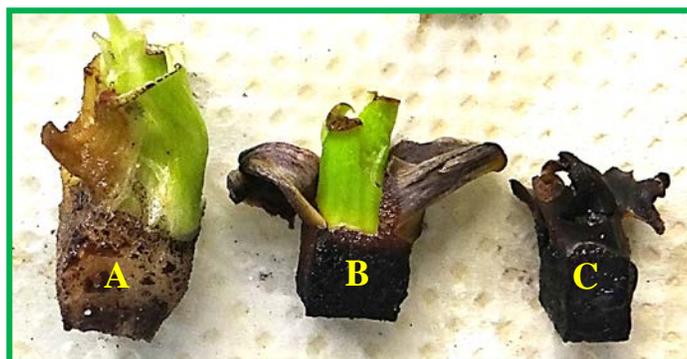
### 4.1. Fase de establecimiento

#### 4.1.1. Fenolización de los ápices caulinares

El establecimiento *in vitro* de tejidos vegetales de algunas especies de plantas, está en gran medida limitado por la presencia de oscurecimientos letales en los explantes y en el medio de cultivo. Esto constituye uno de los problemas más serios y frecuentes, desde el inicio y durante el mantenimiento de un tejido cultivado *in vitro* (Pérez, 1998).

Villalobos y García (1982), citados por Jiménez (1998), plantean que el tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas a medida que el explante es más pequeño, menor es riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras con el aumento del tamaño del explante mayor es el peligro de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración.

A los 30 días del establecimiento los ápices emitieron fenoles. En el medio de cultivo con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA no se presentó el nivel de fenolización leve, mientras que el nivel medio fue el medio de cultivo que menos afectó los ápices con 20%. La fenolización leve se presentó con mayores porcentajes en el medio de cultivo que no contenían reguladores de crecimiento y en el medio que se le agregó  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP con promedios respectivos de 24 y 20%. El medio de cultivo MS +  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP y  $0.5 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA los ápices produjeron el mayor porcentaje del nivel medio de fenoles (64%) y en el medio con  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA indujo el nivel alto de fenolización (80%). En la figura 4 se observan los niveles leve, medio y alto de fenolización en ápices.



**Figura 4.** Niveles de Fenolización de ápices de plátano CEMSA  $\frac{3}{4}$ . **A:** Leve. **B:** Medio. **C:** Alto.

La fenolización se presentó en los tejidos en menor o mayor incidencia, independientemente del contenido de reguladores de crecimiento en las variantes de medios de cultivo y del ácido cítrico que también se agregó como sustancia antioxidante. Los resultados de fenolización en los ápices se presentan en el Cuadro 4.

A pesar de que en el estudio se presentaron niveles altos de fenolización estos no afectaron el crecimiento de los ápices debido a que el corte se realizó a las cuatro semanas por lo tanto la presencia de los fenoles no se convirtieron en una limitante para la absorción de las sales de MS+ los reguladores de crecimiento por parte de los tejidos.

**Cuadro 4.** Variantes de medios de cultivo en el grado de fenolización, porcentaje de contaminación y ápices en crecimiento a los 30 días de establecidos.

Variantes de Medios de cultivo	Reguladores de crecimiento		Fenolización %			Ápices en crecimiento	Ápices Contaminadas
	BAP	AIA	Leve	Media	Alta	(%)	(%)
	(mg l <sup>-1</sup> )						
<b>1</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	24	52	24	72	52
<b>2</b>	<b>0.0</b>	<b>0.5</b>	0	24	76	88	28
<b>3</b>	<b>0.0</b>	<b>1.0</b>	0	20	80	84	28
<b>4</b>	<b>1.0</b>	<b>0.5</b>	0	64	36	20	24
<b>5</b>	<b>1.0</b>	<b>1.0</b>	4	52	44	60	28
<b>6</b>	<b>1.0</b>	<b>0.0</b>	20	48	32	88	24

La oxidación de fenoles que son liberados a través de los cortes de los tejidos en los explantes, lo cual conduce a la producción de una sustancia fitotóxica de color debido a la presencia activa del oxígeno y otros compuestos oxidativos oscuro (Preece y Sutter, 1991). Muchos autores han notado que tejidos café y necrosados no necesariamente son dañinos para la morfogénesis. Según Jiménez (1998), las oxidaciones fenólicas pueden construir un serio problema en el establecimiento y supervivencia de meristemos y ápices. Los fenoles son productos extremadamente lábiles que se oxidan con gran facilidad. Estos productos oxidados pueden ser fitotóxicos y a la vez pueden incrementar los procesos de oxidación debido a que después de oxidados se convierten a la vez en fuertes agentes oxidantes.

Chavarría y López (2010) reportan que los porcentajes de fenolización mostrados por los ápices del cultivar de plátano Cuerno Gigante, están en dependencia de la procedencia del material empleado en la fase de establecimiento y aducen que la presencia de fenoles en los ápices establecidos es mayor cuando éstos se obtienen de cormos extraídos de plantas madres que se encuentran en las plantaciones. Jiménez (1997), plantea que 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.

#### 4.1.2.      **Ápices en crecimiento**

A excepción del medio de cultivo que contenía 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.50 mg l<sup>-1</sup> AIA que registró 20% de ápices en crecimiento, los demás medios de cultivo registraron 60- 88 % de ápices en crecimiento. Los ápices del plátano cv CEMSA ¾ respondieron favorablemente cuando se adicionaron concentraciones entre 0.50 y 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA o 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP, como se aprecia en el cuadro 4. Esta respuesta es evidente considerando que Chavarría y López en el establecimiento de plátano Cuerno Gigante lograron los mejores porcentajes de ápices en crecimiento en los medios que contenían 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA y 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP y en el que no se adicionaron reguladores de crecimiento. Barceló *et al.*, (1995) y Torres y Vázquez (1995) afirman que en los ápices, la citoquinina endógena es muy baja porque se sintetiza en las raíces, de manera que la adición exógena de la misma en los medios de cultivo durante el establecimiento es esencial para el proceso de división celular, facilitando la citocinesis. En la figura 5 se aprecia un ápice de plátano cv CEMSA ¾ en proceso de crecimiento.



**Figura 5.** Ápice de plátano cv CEMSA ¾ en crecimiento

### **4.1.3. Contaminación**

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 favorecen la sobrevivencia *in vitro* de los ápices, además reducen a la mitad el tiempo requerido para su establecimiento y disminuyen notablemente el número de ápices contaminados (Orellana, 1994).

En el presente estudio los cormos provenían de plantas madres que se sembraron en canteros, los explantes no presentaron afectaciones por hongos pero si por la bacteria identificada mediante pruebas morfológicas y bioquímicas como *Sarcina flava*. En los medios de cultivo que se adicionó solo un regulador de crecimiento (AIA o BAP) o los dos combinados, los ápices fueron afectados en porcentajes entre el 24 y 28%; únicamente en el medio de cultivo que no contenía reguladores de crecimiento el porcentaje de contaminación por la bacteria fue superior al 50%.

La contaminación microbiana es uno de los problemas más graves en la micropropagación de especies vegetales a nivel mundial, produce cuantiosas pérdidas de material, tanto en los trabajos de investigación como en la micropropagación comercial. Puede tener dos orígenes: a) microorganismos que colonizan la superficie o el interior del explante (endófitos) y b) microorganismos introducidos durante la manipulación en el laboratorio Debergh *et al.*, 1991; citados por Hernández y Gonzales (2010).

Mroginski y Roca (1991) destacan que 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.

## **4.2. Fase de multiplicación**

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

Jiménez (1998) plantea que el balance entre auxinas y citoquininas es determinante en el coeficiente de multiplicación, si se logra un balance adecuado entre ellas es posible alcanzar altas tasas de proliferación con lo que aumenta la efectividad de la micropropagación, sin embargo es necesario tener cuidado en este aspecto ya que con el empleo de altas concentraciones de citoquininas en el medio de cultivo, pueden ocurrir la formación de multiyemas.

En el aspecto económico es importante incrementar el coeficiente de multiplicación en la propagación *in vitro* de plátano porque disminuyen hasta en un 10% los costos de producción (Pérez, 1998).

#### **4.2.1.1. Primer subcultivo**

En la prueba de comparación de medias del número de brotes no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre las variantes que se agregaron concentraciones de BAP de 1, 2 y 3 mg l<sup>-1</sup> con o sin la adición de AIA, pero si se registraron diferencias estadísticas entre el número de brotes producidos en los medios que se adicionaron 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0 o 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA (1.23 y 1.20 brotes axilares respectivamente) y la media obtenida en el medio que no se agregaron reguladores de crecimiento (0.50 brotes) (Cuadro 5).

En número de hojas que se produjeron en los medios de cultivo que no contenían reguladores de crecimiento y al que se le suministraron 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP las medias respectivas de 3 y 2.40 hojas por planta resultaron iguales estadísticamente. No se registraron diferencias significativas cuando se suministró a los medios de cultivo BAP en concentraciones de 1, 2 y 3 mg l<sup>-1</sup> con o sin la adición de AIA. (Cuadro 5).

En el medio de cultivo utilizado como testigo en la variable de longitud del pseudotallo se presentó la mejor media que superó estadísticamente a las medias obtenidas en las otras variantes de medios de cultivo que se les adicionaron uno o dos reguladores de crecimiento (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Siete variantes de medios de cultivo durante el primer subcultivo en el número de brotes, hojas y longitud del pseudotallo en la fase de multiplicación.

<b>Variantes de Medios de cultivo</b>	<b>BAP</b>	<b>AIA</b>	<b>Número de Brotes</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Longitud del pseudotallo (cm)</b>
	<b>(mg l<sup>-1</sup>)</b>				
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	0.50 b	3.00 a	1.94 a
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.00</b>	1.10 ab	2.16 bc	1.07 b
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0.25</b>	0.76 ab	2.10 bc	1.28 b
<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0.00</b>	1.23 a	2.40 ab	1.32 b
<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0.25</b>	1.20 a	1.76 bc	1.03 b
<b>6</b>	<b>3</b>	<b>0.00</b>	0.96 ab	1.73 bc	0.94 b
<b>7</b>	<b>3</b>	<b>0.25</b>	0.64 ab	1.56 c	0.92 b

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

#### 4.2.1.2. Segundo subcultivo

En los medios de cultivo que contenían 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0,25 mg l<sup>-1</sup> de AIA y con 3 mg l<sup>-1</sup> BAP la media de número de brotes fue significativamente superior a las medias obtenidas en las otras variantes de medios de cultivo. En todos los medios de cultivo que se les agregó 2 ó 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP con o sin AIA el número de brotes fue superior a 2. En el medio de cultivo sin reguladores de crecimiento presentó la menor respuesta estadística con una media de brotes de 0.10. Los resultados estadísticos de las tres variables evaluadas se presentan en el Cuadro 6.

En el Cuadro 6 se observa que entre las medias del número de hojas obtenidas en las diferentes variantes de medios de cultivo estudiadas, no se registraron diferencias estadísticas significativas.

En el medio sin reguladores de crecimiento se presentó la mayor respuesta estadística en la variable longitud del pseudotallo con valor de (2.83 cm). La menor respuesta estadística se obtuvo en los medios que se le adicionaron 1 y 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Siete variantes de medios de cultivo durante el segundo subcultivo en el número de brotes, hojas y longitud del pseudotallo en la fase de multiplicación.

<b>Variantes de Medios de cultivo</b>	<b>BAP</b>	<b>AIA</b>	<b>Número de Brotes</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Longitud del pseudotallo (cm)</b>
	<b>(mg l<sup>-1</sup>)</b>				
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	0.10 d	2.36 a	2.89 a
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.00</b>	1.50 c	2.36 a	1.59 c
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0.25</b>	1.50 c	2.23 a	1.95 b
<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0.00</b>	2.06 b	1.96 a	1.59 c
<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0.25</b>	2.26 ab	2.36 a	1.87 b
<b>6</b>	<b>3</b>	<b>0.00</b>	2.53 a	1.93 a	1.95 b
<b>7</b>	<b>3</b>	<b>0.25</b>	2.03 b	2.16 a	1.90 b

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

#### 4.2.1.3. Tercer subcultivo

Cuando se adicionó 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP + 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA obtuvo una brotación axilar significativamente superior a las medias alcanzadas en las variantes de medios de cultivos que no contenían BAP o AIA y a las que se les proporcionaron 1 y 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP sin AIA o + 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA. En las variantes de medios de cultivo con 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP resultaron similares estadísticamente, como se presenta en el Cuadro 7.

Únicamente el valor de la media de número de hojas en la variante de medio de cultivo que contenía 3 mg/l<sup>-1</sup> de BAP y 0,25 mg l<sup>-1</sup> de AIA resultó estadísticamente inferior. Entre las otras variantes de medios de cultivos se presentaron medias similares estadísticamente (Cuadro 7).

La media de longitud del pseudotallo la variante de medio de cultivo que no contenía reguladores de crecimiento presentó el mayor resultado estadístico, con un promedio de 2.19 cm. El medio de cultivo con 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP y 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA superó significativamente a las medias de longitud de pseudotallo que se agregaron 2 y 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0.25 de AIA (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Siete variantes de medios de cultivo durante el tercer subcultivo en el número de brotes, hojas y longitud del pseudotallo en la fase de multiplicación.

<b>Variantes de Medios de cultivo</b>	<b>BAP (mg l<sup>-1</sup>)</b>	<b>AIA</b>	<b>Número de Brotes</b>	<b>Número de hojas</b>	<b>Longitud del pseudotallo (cm)</b>
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0.00</b>	0.56 c	2.55 a	2.19 a
<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.00</b>	2.20 bc	2.03 ab	1.37 bc
<b>3</b>	<b>1</b>	<b>0.25</b>	2.13 bc	2.52 a	1.56 b
<b>4</b>	<b>2</b>	<b>0.00</b>	2.53 b	2.20 ab	1.33 bc
<b>5</b>	<b>2</b>	<b>0.25</b>	2.10 bc	1.99 ab	1.29 c
<b>6</b>	<b>3</b>	<b>0.00</b>	3.46 ab	2.00 ab	1.33 bc
<b>7</b>	<b>3</b>	<b>0.25</b>	4.55 a	1.78 b	1.19 c

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

El objetivo de la fase de multiplicación es provocar la producción de nuevas plántulas o propágulos, que al ser separados sean capaces de crecer como una planta completa. La multiplicación puede realizarse mediante la formación de brotes axilares, de brotes adventicios o de embriones somáticos, siendo la elección del método de gran importancia, ya que puede afectar a la estabilidad genética de las plantas producidas (Murashige, 1974; Debergh y Maene, 1983).

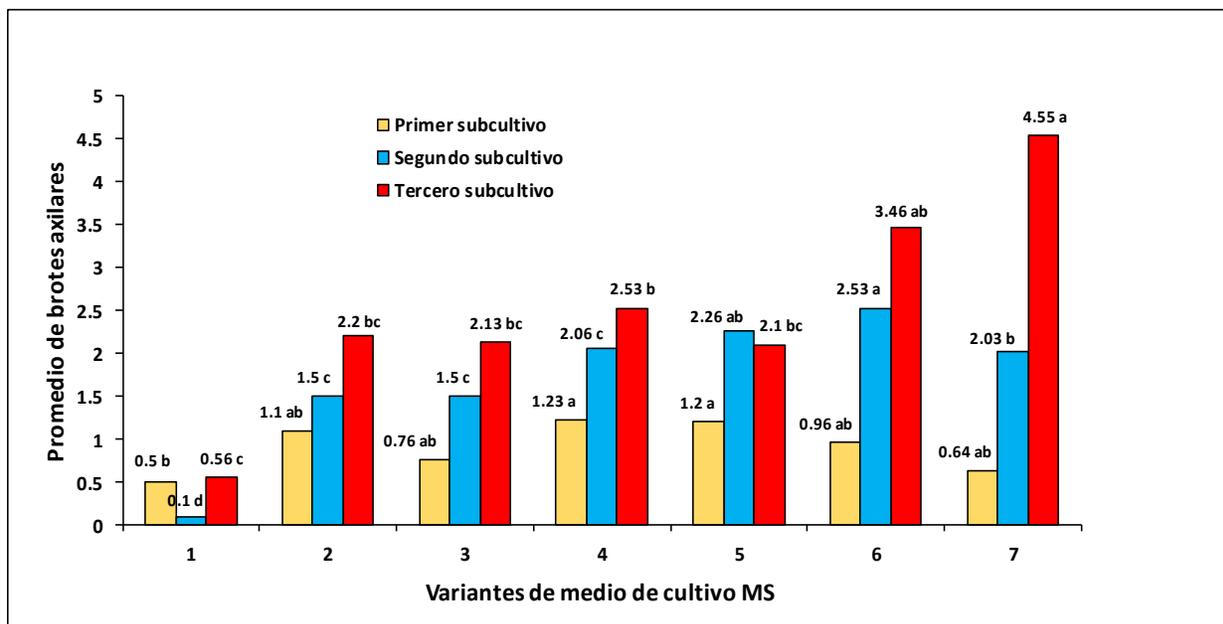
Jiménez (1998) enfatiza que el balance apropiado de auxinas y citoquininas en el medio de cultivo está determinado por las concentraciones endógenas presentes en el explante, las cuales dependen de la especie y del tipo de explante.

En la fase de multiplicación tiene especial importancia la relación citoquinina/ auxina, que varía dependiendo del método de multiplicación elegido. Para la inducción de brotes adventicios se recomiendan concentraciones moderadas de ambas hormonas, sin embargo, para el desarrollo de yemas axilares son necesarias altas concentraciones de citoquininas, añadiéndose a menudo bajas dosis de auxina, que aunque no mejoren las tasas de multiplicación, si mejoran el crecimiento de los brotes (Murashige, 1974; Hu y Wang, 1983).

En el primer subcultivo el bajo número de brotes axilares en las siete variantes de medios de cultivo parece estar determinado por el alto nivel de auxina endógena que aún tienen los ápices caulinares, mecanismo fisiológico que en las plantas es conocido como dominancia apical. El efecto de la auxina en la inhibición de yemas axilares, también se evidenció en la variante de medio de cultivo que no contenía reguladores de crecimiento resultando una brotación axilar baja en los tres subcultivos. Orellana (1998) recomienda que en especies de los géneros *Musa*, *Xanthosoma* y especies de otros géneros que forman en su base un micro corno o un falso tallo, es posible hacer su seccionamiento total o parcial, así como el decapitado con la finalidad de inhibir la dominancia de la yema apical y propiciar el desarrollo de las pequeñas yemas axilares.

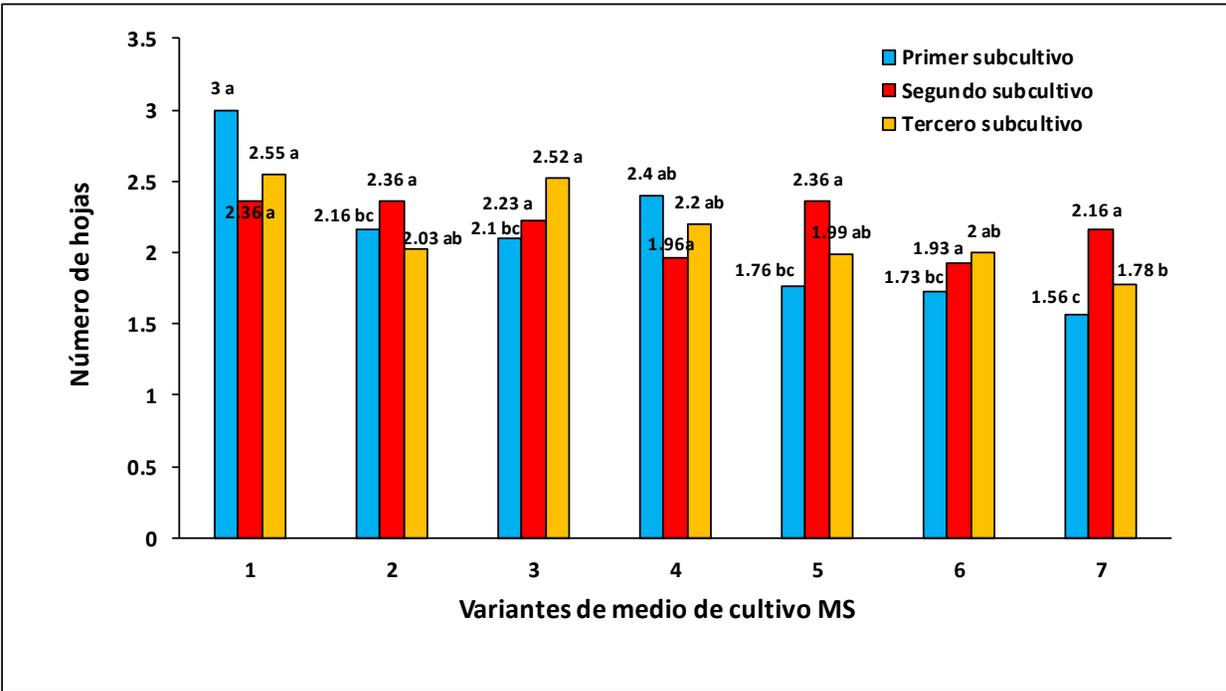
Solo en el segundo subcultivo la media de brotes axilares obtenida en la variante de medio de cultivo que contenía  $2 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP y  $0.25 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA superó al comportamiento de las medias en todas las variantes que se les adicionaron únicamente BAP o en combinación con AIA en el primer subcultivo. En el experimento de multiplicación en el tercer subcultivo cuando se agregó  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP con o sin adición de AIA se logró medias de brotación axilar de 4.55 y 3.46 respectivamente, superiores a las medias obtenidas en el primero y segundo subcultivos, respuesta que refleja el papel que desempeña el BAP como citoquinina en el aumento de la brotación axilar a medida que también se incrementa el número de subcultivos en el plátano cv CEMSA  $\frac{3}{4}$ .

Sin embargo se debe considerar lo señalado por Evans y Bravo (1985), quienes recomiendan que 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 consideradas como fuente de variantes genéticas. Por tanto consideramos que al plátano cv CEMSA  $\frac{3}{4}$  a partir del segundo subcultivo no es conveniente adicionar a los medios de cultivo concentraciones de  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de BAP (Figura 5).



**Figura 6.** Promedios de brotes axilares producidos en siete variantes de medios de cultivo y tres subcultivos sucesivos en plátano cv CEMSA 3/4.

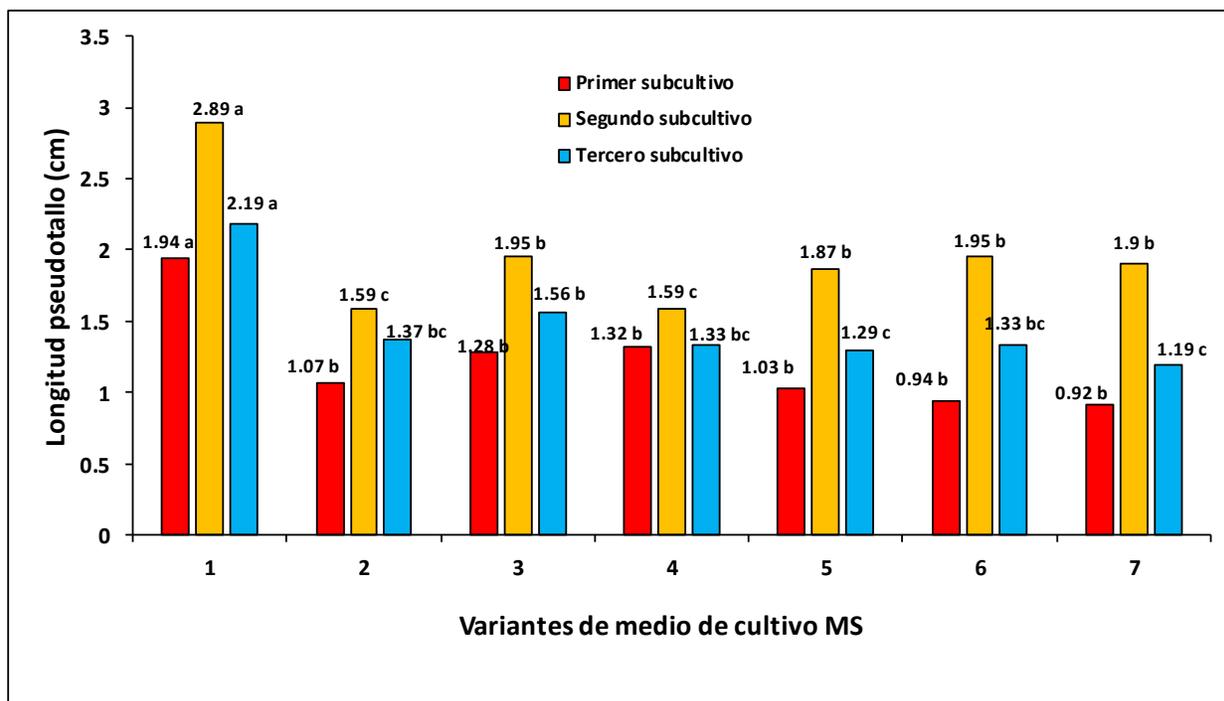
Los resultados en las medias de número de hojas no reflejaron una tendencia de incremento a mayores concentraciones de BAP adicionadas a los medios de cultivo, sino que en los tres subcultivos se obtuvo un comportamiento de las medias muy variante principalmente en los medios que contenían reguladores de crecimiento. Los datos obtenidos reflejaron que en el primer subcultivo se produjo una disminución de número de hojas en los tratamiento a los cuales se les agrego AIA; en el segundo subcultivo no se reflejaron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos; sin embargo el tercer subcultivo se obtuvieron resultados similares al primer subcultivo en el cual hay una disminución en el número de hojas con la adición de AIA. (Figura 6).



**Figura 7.** Número de hojas producidas en siete variantes de medios de cultivo y tres subcultivos sucesivos en plátano cv CEMSA  $\frac{3}{4}$ .

Únicamente en el primer subcultivo en la variante de medio de cultivo que no contenía reguladores de crecimiento se logró un promedio de número de hojas de 3, respuesta que debe estar relacionada con la cantidad de sustancias de reserva y el balance hormonal de citoquininas y auxinas que aún contienen los brotes axilares que se separaron de los ápices caulinares.

En la media de número de hojas por planta, no se apreció una influencia clara de la concentración y tipo de regulador de crecimiento suministrados a las variantes de medios de cultivo, respuesta que parece ser una expresión genotípica del plátano cv CEMSA  $\frac{3}{4}$ , de manera que parece no ser una variable vinculada tanto a la producción de brotes axilares como a la longitud del pseudotallo en las variantes de medios de cultivo utilizadas. Estos resultados no coinciden con lo afirmado por Pierik (1990) que a concentraciones superiores de citoquininas se incrementa significativamente el número de hojas por explante a lo largo del cultivo *in vitro* (Figura 7).



**Figura 8.** Medias de longitud de pseudotallo obtenidas en siete variantes de medios de cultivo y tres subcultivos sucesivos en plátano cv CEMSA ¾.

Las medias de longitud de plantas obtenidas en todas las variantes de medios de cultivo en el primer subcultivo resultaron inferiores a las medias que se presentaron en el segundo y tercer subcultivos, este comportamiento puede estar influenciado por el balance de citoquininas y auxinas que se agregaron a los medios de cultivo, resultando más evidente durante el segundo subcultivo. La mayor elongación de micro tallos correspondió al medio que contenía 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. Calderón y Baltierra *et al.*, (1993).

#### 4.2.2. Número de brotes axilares por BEIT

El número de brotes axilares no se registraron diferencias significativas por efecto de las densidades de siembra de plantas por BEIT. Un aspecto que se debe destacar es que las medias de brotación axilar en el segundo subcultivo fueron inferiores a las obtenidas con el método de micropropagación tradicional que emplea medios de cultivo en estado semi- sólidos y que se les adicionaron concentraciones entre 2 y 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP aplicado solo o combinación con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA y en todas las variantes que se suministró el BAP solo o combinación con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA en el tercer subcultivo. (Cuadro 8).

Únicamente la media de número de hojas que se logró con la siembra 45 tejidos por BEIT resultó significativamente superior a la siembra de 50 tejidos por BEIT con medias respectivas de 2.63 y 1.95 hojas como se aprecia en el cuadro 8.

Con la siembra de 50 brotes axilares por BEIT la media alcanzada en longitud de pseudotallo (2.62) resultó ser significativamente superior a las medias de longitudes de pseudotallo obtenidas cuando se inocularon cantidades de 30, 35 y 40 brotes axilares por BEIT. (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Efecto del volumen del BEIT en las variables número hojas, brotes y longitud del pseudotallo en plátano cv CEMSA ¾

Número de brotes axilares por BEIT	Variables		
	Número de brotes axilares	Número de Hojas	Longitud del pseudotallo (cm)
30	1.33 a	2.23 ab	2.13 c
35	1.27 a	2.43 ab	2.20 c
40	1.34 a	2.26 ab	2.28 bc
45	1.23 a	2.63 a	2.57 ab
50	1.11 a	1.95 b	2.62 a

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

Con el empleo del sistema de inmersión temporal en el presente estudio no se alcanzaron los resultados que reportan diferentes autores en el cultivo de plátano, respuesta que atribuimos a que únicamente se suministró una inmersión cada 24 horas durante tres minutos a causa de limitantes que nos impidieron experimentar con otros factores que se consideran fundamentales para el éxito de la inmersión temporal en el cultivo de plátano. Pérez *et al.* (1998) recomienda que los factores más importantes que deben ser estudiados y que varían considerablemente de una especie a otra y de un tejido o fase de la propagación a otra son a) la duración y frecuencia de las inmersiones, con lo cual se variarían las condiciones dentro del recipiente de cultivo b) suministro de nutrientes y atmósfera gaseosa.

Basail *et al.*, (2011) recomiendan para la micropropagación del cultivar INIVITPV-2011" (AAB) por medio de la técnica de inmersión temporal un tiempo de 10 minutos de inmersión y una

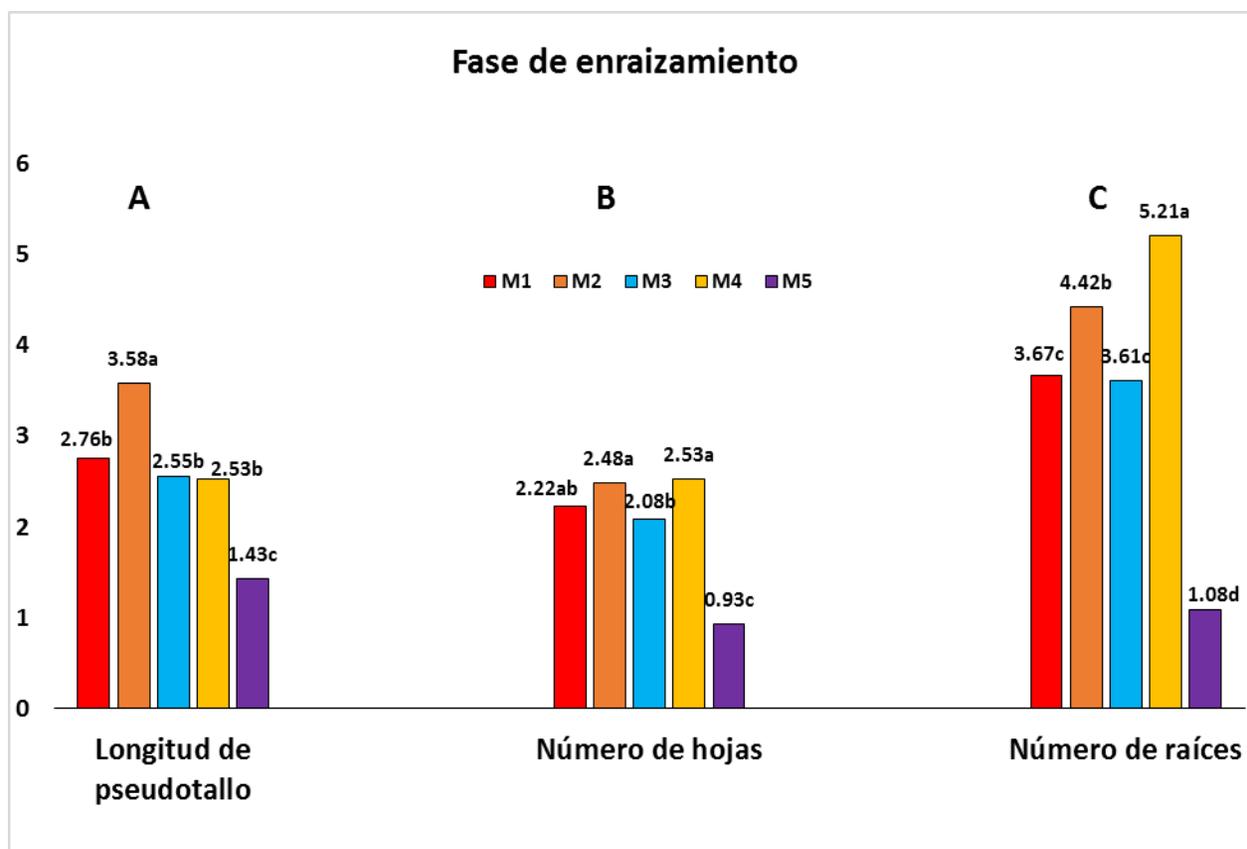
frecuencia cada 3 horas (8 inmersiones al día), con una densidad de inóculo de 60 explantes, un volumen de 3600 ml de medio de cultivo y un tiempo de cultivo de 18 días.

#### **4.3. Fase de enraizamiento en BEIT**

Cuando los brotes axilares crecieron en la variante de medio de cultivo que contenía las sales MS con  $0.25 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA en longitud de pseudotallo se obtuvo una media de 5.58 cm que resultó significativamente superior a las medias que se alcanzaron en las otras variantes de medios de cultivo. La menor respuesta en longitud se logró cuando se adicionó  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA. El comportamiento de las medias se presenta en la figura 8 A.

El comportamiento estadístico de las medias de número de hojas fue similar cuando los brotes axilares crecieron en las variantes de medios de cultivo que no se adicionó AIA y a las que se les proporcionaron  $0.25$  y  $0.75 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA. Similar a la respuesta de la variable de longitud de pseudotallo se presentó la menor respuesta estadística en número de hojas cuando se adicionó  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA como se aprecia en la figura 8 B.

En la variante de medio de cultivo que se agregaron  $0.75 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA se obtuvo una media en número de raíces de 5.21 que superó significativamente a las medias alcanzadas en las otras variantes de medios de cultivo. La adición de  $1 \text{ mg l}^{-1}$  de AIA no favoreció el enraizamiento de las plantas tal como se evidenció en el comportamiento estadístico de las variables longitud de pseudotallo y número de hojas. El comportamiento estadístico de las medias de número de raíces se presenta en la figura 8 C.



**Figura 9.** Comportamiento de medias de las variables. **A)** Longitud de pseudotallo; **B)** Número de hojas; **C)** Número de raíces.

Medias con letras diferentes dentro de cada barra de la variable difieren para  $p \leq 0.05$ .

La evaluación de las variables pseudotallo, número de hojas y raíces respondieron mejor a las sales de MS enriquecidas con concentraciones de 0.25, 0.50 ó 0.75  $\text{mg l}^{-1}$  de AIA, mientras que la adición de 1  $\text{mg l}^{-1}$  de AIA fue estadísticamente inferior en las tres variables. La fase de enraizamiento al efectuarse en BEIT que durante el experimento se le suministró una inmersión de dos minutos por día pudo ser un factor que afectó la respuesta morfológica cuando se agregó 1  $\text{mg l}^{-1}$  de AIA debido a las consideraciones de Hutchinson 1984 de que los medios líquidos en agitación aunque favorecen la rizogénesis, disminuyen la absorción de auxinas teniendo como resultado la vitrificación de las plantas que afecta generalmente su aclimatación.

Con el empleo de los BEIT no se observó que las plantas fueran afectadas en ninguna de las variantes de medios de cultivo, debido que el sistema BEIT garantiza que los tejidos permanezcan sobre la superficie de un soporte de consistencia suave como se observa en la figura 9 y no sumergidos en el medio de cultivo.



**Figura 10.** Plantas de plátano cv CEMSA ¾ en fase de enraizamiento en las variantes de medios de cultivo (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, M<sub>3</sub>, M<sub>4</sub> y M<sub>5</sub>).

Machakova *et al.*, (2008), consideran que la elección del tipo de auxina y su concentración dependen entre otros factores del tipo de crecimiento o desarrollo requerido; de la tasa de toma y transporte de la auxina aplicada en el tejido; de la inactivación de la auxina en el medio y en el explante; de los niveles naturales de auxina y la síntesis endógena en el explante y de la interacción, si existiera, entre la auxina suministrada y las sustancias naturales endógenas.

## V. CONCLUSIONES

En la fase de establecimiento los ápices del plátano cv CEMSA ¾ respondieron cuando se adicionaron concentraciones entre 0.50 y 1 mg l<sup>-1</sup> de AIA y el suministro de 1 mg l<sup>-1</sup> de BAP.

En el primer subcultivo se obtuvieron las mejores medias de brotes axilares en los medios de cultivo que contenían solamente 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP o combinado con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA. En el segundo subcultivo las mejores medias de brotes axilares resultaron con adiciones de 2 mg l<sup>-1</sup> de BAP con 0.25 mg l<sup>-1</sup> de AIA o con solamente 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP. En el tercer subcultivo la brotación de yemas axilares resultó mejor con adiciones de 3 mg l<sup>-1</sup> de BAP con o sin adición de AIA.

En número de brotes axilares no se registraron diferencias significativas por efecto de las densidades de siembra de 30, 40, 45 y 50 brotes por BEIT, pero se observó que con la siembra de 50 brotes axilares la media de número de hojas fue menor y mayor alargamiento del pseudotallo como respuesta a la competencia de las plantas por la luz dentro del BEIT.

La longitud del pseudotallo, el número de hojas y el número de raíces respondieron favorablemente a las sales de MS enriquecidas con concentraciones de 0.25, 0.50 y 0.75 mg l<sup>-1</sup> de AIA.

## VI. RECOMENDACIONES

Experimentar con distintos factores que inciden en la brotación axilar en el sistema BEIT para mejorar la eficiencia del sistema en la producción masiva de plátano cv CEMSA ¾.

Incorporar la fase de aclimatación, con el objetivo de conocer el comportamiento y crecimiento de las plantas *in vitro* en futuras plantaciones.

Estudiar el comportamiento de las plantas *in vitro* de plátano cv CEMSA ¾ en condiciones de campo evaluando su manejo agronómico, el comportamiento fisiológico y la estabilidad genética

Realizar un análisis económico con el objetivo de determinar la factibilidad en la producción de plantas *in vitro* del plátano cv CEMSA ¾

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Maradiaga, M. 2014.** Propuesta de Biorreactores económicos de inmersión temporal (BEIT) para la producción de plantas *in vitro* a escala comercial. VII Edición del Premio Nacional a la innovación. Managua, NI. 19 p.
- Aguilar Maradiaga, M; Reyes Castro, G; Acuña Pérez, M. 2004.** Métodos alternativos de propagación de semilla agámica de Plátano (*Musa sp.*). Ed. F. Alemán. Managua. NI, Universidad Nacional Agraria. 20 p. (Guía Técnica 1).
- Aitken-Christie, J., Davies, H.E., Kubota, C., Kosai, T. 1995.** Automation in Plant Tissue Culture. General introduction overview: Automation and environment control in *Plant Tissue Culture Kluwer*, Academic Publisher, Dordrech. 1-19 p.
- Azofeifa A. 2009.** Problemas de oxidación y explantes cultivos *in vitro*. (En línea). Agronomía Mesoamericana. Consultado el 13 Ago 2015. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v20n01\\_153.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v20n01_153.pdf)
- Barceló et al. 1995.** Fisiología Vegetal. Ciencia y técnicas. Ediciones Pirámide S.A Séptima edición. 120-320 p.
- Basail Pérez, M; Medero Vega, V; Torres Delgado, M; López Torres, J; Santos Pino, A; Rayas Cabrera, A; Bauta Toledo, M; Beovidez García, Y; Ortega Ortiz, A. 2013.** Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda “INIVITPV-2011” (AAB) en: Revista Colombiana de Biotecnología, vol. XV, núm. 1, enero-junio, 98-107 p.
- Caldera, C. L; López, R. J. 2002.** Mejoramiento de la eficiencia de propagación *in vitro* de plátano (*musa* AAB cultivar enano). (Tesis) Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua, 1- 13 p.
- Calderón-Baltierra X, F Pérez, A Rotella. 1993.** Micripropagación de una especie Chilena “en peligro” de extinción: Gomortega keule (Mol.). Baillon (Magnoliopsidae, Gomortegaceae). Bosque 14(1): 23-28 p.
- CENAGRO (Censo Nacional Agropecuario, NI). 2011.** Informe Final IV censo Nacional Agropecuario. Managua Nicaragua. INIDE. 70 P.
- Chavarría Castillo, D; López Montenegro, G. 2010.** Micropropagación de ápices caulinares en plátano (*Musa sp.* AAB) cultivar Cuerno Gigante. (En línea). Managua, NI. Tesis Ing. Agron. Consultado 11 Mar 2014. Disponible en <http://cenida.una.edu.ni/Tesis/tnf02c512m.pdf>.

- Debergh, P. C; Maene, L. J. 1983.** Contribution of tissue culture techniques to horticultural research and production. Acta horticulture.131 p.
- Evans, D. A; Bravo J. E. 1985.** Phenotypic and genotypic stability of tissue cultured plants. In: Zimmerman, R. H. *et al* (Eds.). Tissue culture as a plant Production System for Horticulture Crops, 73-91 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2000.** Anuario de producción. Vol 54.
- Hernández, Y; González, M. 2010.** Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. En: Cultivos Tropicales. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana, Cuba, vol. 31, núm 4, 58-69 p.
- Hu, S.Z; Wang, T.S. 1983.** Meristem, shoot tip and bud culture. En: Handbook of Plant Cell Culture: Techniques for propagation and Breeding. Evans, D.A, Sharp, W.R, Ammirato, P.V y Yamada, Y. (Eds.). Macmillian, New York, 117-227 p.
- Hutchinson, J.F. 1984.** Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple "Northern spy".Scientia Horticulturae, Amsterdam, v.22. 347-358 p.
- 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. 45-46 p.
- Jiménez, G. E. 1997.** Conferencias del Curso Internacional de Propagación *in vitro* de especies vegetales. IBP, Septiembre 11-19 de 1997. Santa Clara, Cuba. 127-134 p.
- 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.
- MIFIC (Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, NI). 2012.** Análisis de Encadenamientos Productivos para la Generación de Valor Agregado en Nueve Cadenas Agroalimentarias Ubicadas en las Zonas de Mayor Potencial Productivo de Nicaragua. Managua, NI. Gobierno de Reconciliación y Unidad Nacional. 133 p.
- Machakova, I., Zazimalova, E and George, E.F. 2008.** Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. En: Plant Propagation by Tissue Culture 3<sup>rd</sup> Edition, Vol. 1.The Background. George, E.F., Hall, M.A. y De Klerk G.-J. (Eds.). Springer, Dordrecht. The Netherlands. 175-204 p.

- 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 p.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 473-497 p.
- Murashige, T. 1994.** Plant Propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 25. 71-79 p.
- 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.
- Orellana, P. 1998.** Introducción a la propagación masiva. En: propagación y mejora genética de las plantas por Biotecnología. (Ed) Instituto de biotecnología de las plantas, Universidad Central de las Villa, Santa Clara, Cuba. 151-178 p.
- Pérez, J.N; Jiménez y D. Agramonte. 1998.** Aumento de la eficiencia de la propagación masiva: en propagación y mejora genética de las plantas por biotecnología (ed.) Santa Clara, Cuba. 179-190 p.
- Pérez Ponce, J.N. 1998.** Propagación vía organogénesis. En: Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología. (Ed.). Santa Clara, Cuba. IBP. 162-163 p.
- Pierik, R. L. 1990.** Cultivo *in vitro* de las plantas superiores. (ed.) Mundi-Prensa.
- Preece, J.E; Sutter, M.E. 1991.** Acclimatization of micropropagation plants to the greenhouse and field. In: P.C Debergh and R.H Zimmerman (Eds.). *Micropropagation Technology and application*, Kluwer Academic Publishers. 88-93 p.
- 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 p.
- Vázquez, B.E; Torres, S. 1995.** Fisiología vegetal. Crecimiento y desarrollo. (ed.) Pueblo y Educacion. La Habana, Cuba. 317-362 p.