

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

**"EFECTO DE LA BENCILAMINOPURINA (BA) Y DOS METODOS DE MICROPROPAGACION
SOBRE DOS CULTIVARES DE PLATANO (*Musa balbisiana* Colla)"**



EN EL ACTO DE SU INVESTIDURA COMO

INGENIERA AGRONOMA

EN

SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE

LICENCIADA

GUATEMALA, MAYO DE 1,999.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

Ing. Agr. EFRAIN MEDINA GUERRA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	Ing. Agr. JOSE ROLANDO LARA ALECIO
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. JUAN JOSE CASTILLO MONT
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. WILLIAM ROBERTO ESCOBAR LOPEZ
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. ALEJANDRO ARNOLDO HERNANDEZ FIGUEROA
VOCAL CUARTO	Br. OSCAR JAVIER GUEVARA PINEDA
VOCAL QUINTO	Br. JOSE DOMINGO MENDOZA CIPRIANO
SECRETARIO	Ing. Agr. GUILLERMO EDILBERTO MENDEZ BETETA

Guatemala, Mayo de 1,999.

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señores Miembros:

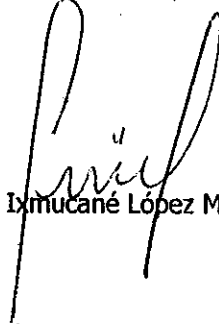
De conformidad con la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

**"EFECTO DE LA BENCILAMINOPURINA (BA) Y DOS METODOS DE MICROPROPAGACION
SOBRE DOS CULTIVARES DE PLATANO (*Musa balbisiana* Colla)"**

Como requisito previo a optar el título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que la presente investigación llene los requisitos necesarios para la aprobación, me suscribo.

Atentamente,



Claudia Ixmucané López Morales

AGRADECIMIENTOS

A:

Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Mis asesores:

Ing. Agr. Héctor Sagastume

Ing. Agr. Domingo Amador

Personal de Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Ciencias y Tecnología Agrícolas (ICTA).

Ing. Fernando Rodríguez Bracamonte.

CONTENIDO

INDICE DE CUADROS	vi
INDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCION	1
2. DEFINICION DEL PROBLEMA	2
3. JUSTIFICACION	3
4. MARCO TEORICO	4
4.1 Marco Conceptual	4
4.1.1 El género <u>Musa</u>	4
4.1.2 Morfología de las Musáceas	5
4.1.2.1 El cormo	7
4.1.2.2 Las raíces	7
4.1.2.3 El pseudotallo	7
4.1.3 Fisiología de género <u>Musa</u>	8
4.1.3.1 Desarrollo del retoño	8
4.1.3.2 Las raíces	8
4.1.3.3 El retoño de hojas angostas	9
4.1.3.4 Independencia del retoño	9
4.1.3.5 Desarrollo de la hoja	10
4.1.3.6 El cormo	11
4.1.3.7 Formación de yemas	11
4.1.3.8 Diferenciación floral	12
4.1.3.9 Desarrollo de la inflorescencia	13
4.1.4 Micropropagación en <u>Musa</u>	14
4.1.4.1 Fases de la micropropagación	16
Fase I Iniciación o establecimiento	17
Fase II Multiplicación	17
Fase III Enraizamiento	18
Fase IV Aclimatación	18
4.1.4.2 Problemas en la micropropagación	20
A. Contaminación	20
a. Microorganismos	20
b. Procedimientos defectuosos	21
B. Oxidación	22
C. Número de subcultivos	23
D. Vitrificación	24
4.1.4.3 Medios de cultivo en <u>Musa</u>	24
A. Agua	25
B. Nutrientes minerales	25
C. Vitaminas	25
D. Azúcares	26
E. Nitrógeno orgánico	26
F. Agar	26
G. pH	27
4.1.4.4 Reguladores del crecimiento	27
A. Auxinas	28
B. Citocinas	29
4.1.5 Cultivo de ápices meristemáticos	31
4.1.5.1 Bases fisiológicas del cultivo de ápices meristemáticos	33
A. Tejido meristemático de crecimiento	33
B. Crecimiento apical	33
C. Dominancia apical	34
D. División celular	35
E. Estudio histomorfológico de la proliferación de brotes	36

4.2	Marco Referencial	38
4.2.1	Propagación de Musáceas	38
4.2.2	Micropropagación en Musáceas	40
5.	OBJETIVOS	44
6.	HIPOTESIS	45
7.	METODOLOGIA	46
7.1	Area experimental	46
7.2	Material experimental	46
7.2.1	<i>Musa balbisiana</i> c.v. Hembra (AAB)	46
7.2.2	<i>Musa balbisiana</i> c.v. Cuernos (AAB)	46
7.2.3	Bencilaminopurina	47
7.3	Manejo del experimento	47
7.3.1	Selección planta madre	47
7.3.2	Selección hijuelo	48
7.3.3	Desinfección del material experimental	48
7.3.4	Metodología tradicional	49
7.3.4.1	Fase de iniciación	49
7.3.4.2	Fase de multiplicación	49
7.3.5	Metodología taiwanesa	50
7.3.5.1	Fase de iniciación	50
7.3.5.2	Fase de multiplicación	51
7.4	Diseño experimental	52
7.5	Modelo estadístico	52
7.6	Análisis estadístico	52
7.7	Variables respuesta	53
7.7.1	Número de brotes	53
7.7.2	Altura de brotes	53
7.8	Unidad experimental	53
7.9	Tratamientos	53
8.	RESULTADOS Y DISCUSION	55
8.1	Desinfección del material inicial	55
8.2	Fase de iniciación	55
8.3	Fase de multiplicación	56
9.	CONCLUSIONES	65
10.	RECOMENDACIONES	66
11.	BIBLIOGRAFIA	67
12.	ANEXO	69

INDICE DE CUADROS

		Página
CUADRO 1	Tratamientos considerados en la micropropagación de plátano	54
CUADRO 2	Análisis de varianza para la variable número de brotes	57
CUADRO 3	Resumen de la prueba de Duncan para la variable número de brotes en las diferentes combinaciones	58
CUADRO 4	Análisis de varianza para la variable longitud de brotes	63
CUADRO 5	Prueba de medidas de Duncan para 16 tratamientos para la variable longitud (cm) de brotes, en micropropagación de plátano	64
CUADRO 6A	Datos originales generados en el estudio de micropropagación en plátano	71
CUADRO 7A	Resumen del análisis de varianza para la variable número de brotes en distintos tratamientos	74
CUADRO 8A	Resumen del análisis de varianza para la variable longitud de brotes, (cm) en distintos tratamientos	75

INDICE DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Vista esquemática de una planta de plátano (<i>Musa balbisiana</i> Colla) en fructificación	6
FIGURA 2	Ontogénesis de la formación de nuevos brotes de un meristemo apical	38
FIGURA 3	Promedios de número de brotes por nivel de Bencilaminopurina para dos metodologías de micropropagación	59
FIGURA 4	Promedios de longitud (cm) de brotes por nivel de Bencilaminopurina para dos metodologías de micropropagación	62

**"EFECTO DE LA BENCILAMINOPURINA (BA) Y DOS METODOS DE MICROPROPAGACION
SOBRE DOS CULTIVARES DE PLATANO (*Musa balbisiana* Colla)"**

**"BENZYLAMINOPURINE (BA) AND TWO MICROPROPAGATION METHODS
ON TWO PLANTAIN CULTIVARS (*Musa balbisiana* Colla)"**

RESUMEN

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA), Bárcenas, Villa Nueva, Guatemala, con la finalidad de evaluar la respuesta en la Fase de Multiplicación de dos cultivares de plátano (*Musa balbisiana* Colla), a dos metodologías de micropropagación utilizando distintas concentraciones de Bencilaminopurina, un regulador del crecimiento que pertenece al grupo de las citocininas.

Los cultivares evaluados fueron el "Hembra" y el "Cuernos" procedentes de la región surOccidental del país; las metodologías utilizadas fueron la tradicional y la taiwanesa; ésta última desarrollada en Taiwan, por el Instituto de Investigación del Banano; y los niveles de Bencilaminopurina correspondieron a dos, tres, cuatro y cinco miligramos por litro.

La eficiencia de cada metodología se determinó por el número de brotes que fueron capaces de formar, a partir de un explante inicial que consistió en un ápice meristemático.

Para ello se establecieron 16 tratamientos con diez repeticiones cada uno; resultantes de la combinación de los dos cultivares, con las dos metodologías y los cuatro niveles de Bencilaminopurina. El ensayo se dispuso en un diseño de bloques al azar.

El trabajo se dividió en dos fases: la primera o de iniciación, donde el explante se adaptó fisiológicamente a las nuevas condiciones *in vitro*, y se controló la oxidación del mismo carbón activado al medio. La otra fase, fue la de multiplicación, donde ocurrió la proliferación de brotes. El medio utilizado fue el de Murashige y Skoog (1962).

Los resultados indicaron que a través de la metodología taiwanesa se obtuvo el mayor número de brotes, en ambos cultivares, con un promedio de 10 brotes por explante, utilizando cuatro y cinco miligramos por litro; número superior al logrado con la metodología tradicional, que fue de cuatro brotes, para los mismos niveles de Bencilaminopurina y cultivares.

La alta tasa de proliferación obtenida en la metodología taiwanesa, se debió en parte, al hecho de cortar el meristema apical del explante, lo que rompió la dominancia apical e indujo a la formación de mayor número de brotes.

Se encontró que el máximo número de brotes se obtuvo con cuatro y cinco miligramos por litro de Bencilaminopurina, siendo mejor la utilización del menor nivel, ya que altas concentraciones pueden aumentar el número de mutaciones.

Los brotes obtenidos presentaron una altura promedio de 1.9 cm, con dos o tres hojas formadas, considerándose aptos para su traslado a la siguiente fase, que es la de enraizamiento.

1. INTRODUCCION

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta muy útil en la propagación de Musáceas, particularmente por el hecho de que las variedades comestibles de plátano (*Musa balbisiana* Colla) y banano (*Musa acuminata* Colla), son triploides, partenocárpicas y estériles, y por ende su reproducción es asexual o vegetativa (a través de cormos), lo que implica una baja tasa de multiplicación y en muchos casos provoca problemas fitosanitarios, ya que al utilizar material contaminado, hay posibilidades de diseminar plagas y enfermedades en áreas libres de éstas. (6)

El plátano (*Musa balbisiana* Colla) es una especie importante en la dieta alimenticia de millones de personas en las regiones tropicales del mundo, ya que es fuente de minerales, vitaminas y carbohidratos. En Guatemala es ampliamente producido y consumido, cultivándose en 1997, según estadísticas del Banco de Guatemala (14) 6,590 hectáreas con una producción de 250,000 toneladas, cosechándose todo el año, generando fuentes de trabajo y asegurando al productor un ingreso monetario continuo.

Dada la importancia económica y alimenticia del cultivo, su propagación a gran escala, utilizando técnicas de micropropagación, proporciona ciertas ventajas sobre la propagación tradicional, entre ellas: control de la sanidad del material, alto índice de multiplicación en espacio y tiempo reducidos, no depende de condiciones ambientales para implementarse y las plantaciones son más homogéneas. (24)

De las distintas técnicas de micropropagación que se utilizan en Musáceas, en este trabajo se evaluaron dos de ellas: la descrita por el Fondo Hondureño de Investigación Agrícola (en Honduras), y la desarrollada en el Instituto Taiwanés de Investigación del Banano (en Taiwan). Para el efecto se utilizaron dos cultivares de plátano, el c.v. "Hembra" proveniente del municipio de Cuyuta, en Escuintla y el c.v. "Cuernos" procedente del Parcelamiento La Blanca Ocos, en San Marcos; y cuatro niveles de Bencilaminopurina (BA); con el fin de determinar la metodología más eficiente, el nivel óptimo de BA y la respuesta de ambos cultivares.

Los tratamientos resultantes de la combinación de los tres factores, fueron 16 arreglos en un diseño de bloques al azar con 10 repeticiones.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA

Aunque el plátano (*Musa balbisiana* Colla) es un cultivo importante en la agricultura Guatemalteca, desde el punto de vista económico y alimenticio, la mayor parte de las investigaciones y desarrollo de nuevas metodologías de propagación *in vitro* están orientadas al banano (*Musa acuminata* Colla), especialmente al que se cultiva con fines de exportación.

De acuerdo con Pocasangre (24) en la actualidad la tasa de micropropagación reportada en plátano, utilizando la metodología tradicional es de dos a tres brotes cada mes, la cual se considera muy baja para fines de micropropagación masiva comercial.

Cultivares de plátano que se cultivan en el país, y que son ampliamente consumidos por la población, como los cultivares "Hembra" y "Cuernos", aún no han sido evaluados con técnicas de cultivo *in vitro*, por lo que no se conoce con certeza su respuesta, particularmente en lo referente a su capacidad para desarrollar una alta tasa de proliferación de brotes.

3. JUSTIFICACION

El Cultivo de Tejidos es probablemente el ejemplo más importante de la aplicación de la Biotecnología en la agricultura, por lo que el empleo de estas técnicas se difunde cada vez más, ya que permite la propagación de grandes cantidades de plantas en espacio y tiempo reducidos, manteniendo las características agronómicas del material y garantizando la sanidad del mismo. (24)

Como la propagación in vitro tiene un alto potencial en el cultivo del plátano (*Musa balbisiana* Colla), es importante evaluar la respuesta de materiales cultivados en el país, para definir un primer paso en la implementación de metodologías, que conduzcan en un futuro a el establecimiento de plantaciones comerciales que produzcan frutos con mejores características (dimensiones), mayor precocidad y homogeneidad .

Por lo que cualquier metodología que pretenda incrementar la eficiencia de la producción, a través de la proliferación de brotes, es importante de evaluar y validar, principalmente con materiales criollos de amplia aceptación en el mercado nacional, para proponer una alternativa más en la micropropagación masiva del plátano.

4. MARCO TEORICO

4.1 Marco Conceptual

4.1.1 El género Musa

Los plátanos (*Musa balbisiana* Colla) y bananos (*Musa acuminata* Colla) pertenecen al género *Musa*, de la familia *Musaceae*. Este género fue creado por Carlos Linneo en honor a Antonio Musa, célebre médico de comienzos del imperio romano. Se divide en cuatro secciones de las cuales la sección *Eumusa* incluye los bananos y plátanos comestibles así como sus parientes silvestres. (10)

Según León (19), el plátano es una hierba gigante y perenne, monocotiledónea cuyo tallo verdadero es el cormo. El pseudotallo (eje aéreo) está formado por vainas foliares que rodean el ápice del tallo que se encuentra localizado en la base del pseudotallo.

El número cromosómico básico $n=11$ y el nivel de ploidía varía según la especie. La mayoría de los bananos y plátanos son híbridos interespecíficos de las dos especies silvestre *Musa acuminata* Colla (genoma AA) y *Musa balbisiana* Colla (genoma BB). La especie *Musa acuminata* Colla contiene mayor variabilidad genética y abarca cerca de seis subespecies, algunas todavía no bien definidas y cada una con su propia distribución en Asia y aún en Oceanía (33):

Musa acuminata spp. *malaccensis*
 spp. *burmannicoides*
 spp. *burmannica*
 spp. *banskii*
 spp. *microcarpa*
 spp. *siamea*.

En *Musa balbisiana* Colla se reconocen varios tipos importantes (33):

Musa balbisiana spp. *cameroun*
 spp. *honduras*
 spp. *tani*
 spp. *Lar Velchi*.

Los híbridos interespecíficos se agrupan de acuerdo a la contribución de cada una de las especies silvestres a la ploidía (variaciones en el número de juegos cromosómicos). Dependiendo de la combinación de genomas encontramos tipos diploides, triploides y tetraploides. En la naturaleza se han identificado los grupos AA, AB, BB, AAA, AAB y ABBB. Estos incluyen entre 300-500 genotipos. (33)

Para Stover (33) el desarrollo de bananos comestibles inicialmente fue el resultado de la selección del diploide *Musa acuminata* Colla que incluye variedades partenocárpicas. Los cultivares AA dieron lugar a la formación de triploides AAA a través de restitución cromosómica durante la meiosis. La mayoría de los bananos de exportación pertenecen a este grupo. Un paso importante en la evolución del banano fue el cruce natural entre *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla que produjo híbridos diploides, triploides y tetraploides. Esto extendió el rango de sus características y contribuyó a difundir su cultivo de las tierras húmedas bajas del trópico a las tierras altas y estaciones más secas.

4.1.2 Morfología de las Musáceas

De acuerdo con Champion (10), los bananos y plátanos son plantas herbáceas con pseudotallos aéreos que se originan de cormos carnosos de los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales o "hijos". Las hojas tienen una distribución helicoidal (filotaxia espiral) y las bases foliares circundan el tallo o cormo, dando origen al pseudotallo hasta alcanzar el follaje superior y salir. Cada pseudotallo produce sólo una inflorescencia y luego muere; la planta continúa su ciclo de vida a través de la formación de hijuelos laterales, tal como se presenta en la figura 1, donde es posible observar una planta de plátano en plena fructificación. De esta manera la planta puede propagarse vegetativamente por tiempo aparentemente indefinido.

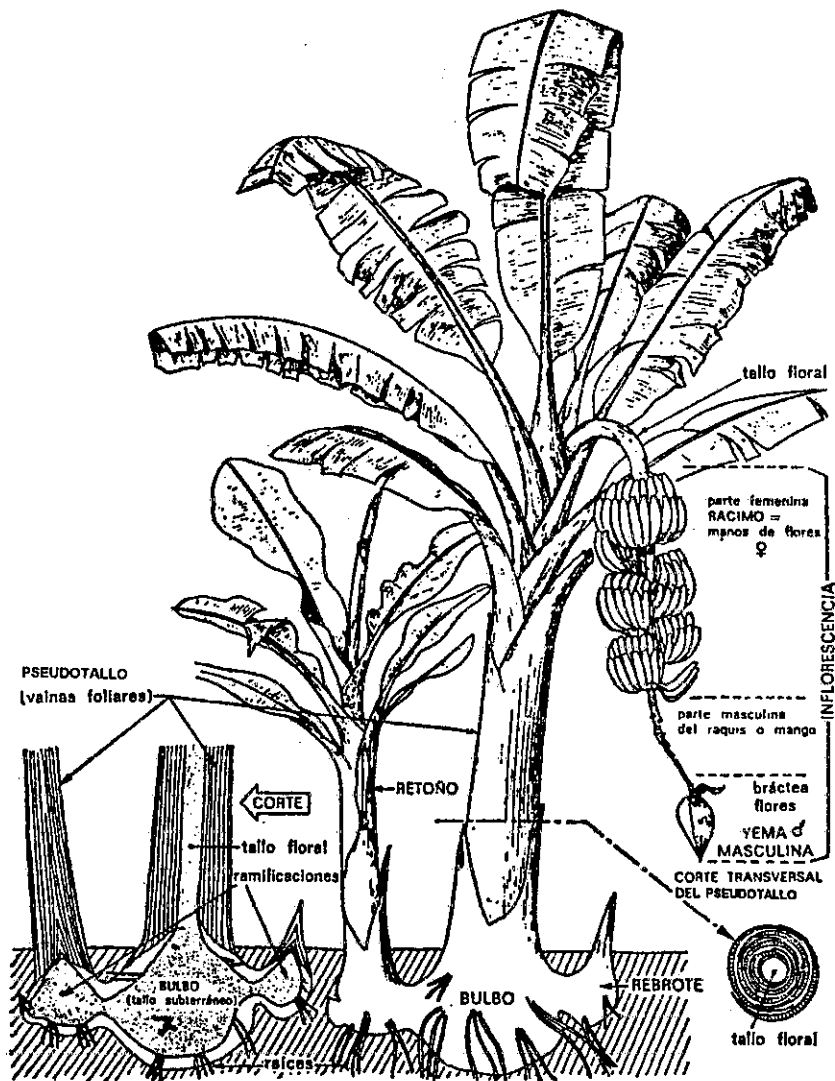


FIGURA 1 VISTA ESQUEMATICA DE UN PLATANO EN FRUCTIFICACION, JUNTO CON SUS REBOTES
(FUENTE: EL PLATANO; J. CHAMPION)

4.1.2.1 El cormo

El tallo subterráneo de las *Musáceas*, tiene forma cónica o asimétrica, con entrenudos cortos, de éstos brotan raíces en grupos de tres o cuatro y en la parte apical del cormo aparecen las hojas, que nacen en la única zona activa del tallo, en la región meristemática situada en la parte superior y en la que se desarrollan muchas hojas y el escapo floral, esta zona mide aproximadamente tres centímetros a cada lado del punto apical del cormo. Las yemas que salen del cormo original brotan siguiendo una espiral que se cierra ligeramente hacia arriba. La superficie del cormo está cubierta por la epidermis, que luego es reemplazada conforme se desarrolla la planta, por capas corchosas corticales. El cormo carece de hojas carnosas y está cubierto de hojas escamosas. (19)

4.1.2.2 Las raíces

Si el cormo se encuentra bien desarrollado casi todas las raíces salen de la parte superior, debajo de la inserción de las hojas y van disminuyendo en número hacia la parte inferior. Las raíces son blancas, cilíndricas y tiernas en sus primeras etapas, al madurar la planta la epidermis se reemplaza por tejido suberizado más profundo, denominado exodermis. La región cortical se forma de dos zonas, una externa de parenquima radial, que limita con la endodermis. En el cilindro central aparecen numerosos vasos grandes de xilema y grupos más reducidos de células de floema, rodeados de un tejido uniforme de colénquima. (10,19)

4.1.2.3 El pseudotallo

El pseudotallo es la parte aérea de la planta, está constituido por las vainas envolventes de las hojas. En corte transversal el pseudotallo muestra la disposición de las vainas foliares, que aparecen como medias lunas compactas, con sus bordes finos ajustados firmemente a las vainas vecinas. Las hojas nuevas son las internas, que deben abrirse paso para salir y extender las láminas y se presentan como rollos apretados en el centro del pseudotallo. (10)

4.1.3 Fisiología del género Musa

En los plátanos y bananos, la planta madre muere después de producir el racimo, pero en cada mata quedan hijos que llevan adelante la perpetuación de la especie, continuando con un ciclo fisiológico que se describe a continuación:

4.1.3.1 Desarrollo del retoño

Al observar un cormo se constata la presencia de varios brotes o yemas individualizados, estos poseen la siguiente estructura: la parte saliente presenta forma de cono muy aplastado formado por escamas triangulares fuertemente sobrepuestas unas en otras. (9)

La yema en un principio se desarrolla perpendicular a la superficie del cormo, debido a la tierra que la envuelve; luego su extremo tiende a enderezarse, sufriendo una influencia geotrópica negativa, aparte de que las escamas foliares se han desarrollado más en la parte basal. Cuando el diámetro de la yema es de seis u ocho centímetros, la parte basal se ensancha y redondea, y el efecto es una constricción entre el cormo y el retoño. Si se hace un corte longitudinal, se observa que el cilindro central o estela se une directamente al cormo principal. (9,10)

4.1.3.2 Las raíces

Las raíces del plátano se van diferenciando continuamente según el crecimiento del meristema. La diferenciación de estas prosigue hasta el momento en que el tallo verdadero se hace aéreo, la emisión de raíces cesa por lo tanto poco después de la floración. Primero son blancas y tiernas, y según van envejeciendo, se tornan amarillas y se endurecen ligeramente. Su diámetro puede ser de cinco a ocho milímetros y su longitud puede pasar de los tres o cuatro metros. Estas raíces primarias, emiten un abundante número de raíces secundarias de dos milímetros aproximadamente, y que pueden ramificarse en su parte apical, cuando esta tropieza con un obstáculo duro o compacto. Su potencia de penetración es débil. (9)

En el transcurso de su desarrollo, el plátano produce un número variable de raíces, que al parecer está en relación con la potencia vegetativa de la planta y con el volumen del cormo. Puede considerarse que la emisión de raíces es independiente de la formación de hojas anchas y que por intermedio del sistema de la planta madre, contribuyen a la nutrición de ésta y sus retoños. (9,10)

4.1.3.3 El retoño de hojas angostas

Las escamas foliares, según van apareciendo, se convierten en triángulos de altura cada vez mayor y con características más parecidas a las de la vaina foliar; la inserción basal da la vuelta completa al cormo y la extremidad es puntiaguda. El enderezamiento del retoño es rápido y su parte superior se alarga casi verticalmente mientras que el rizoma continúa desarrollándose y adquiriendo una forma vagamente esférica. Por otro lado, la zona de unión al cormo principal engrosa relativamente mucho menos y la diferenciación de la ramificación se hace cada vez más evidente. La parte superior del retoño perfora la superficie del suelo, el crecimiento prosigue de la misma forma, es decir con hojas reducidas a una faja triangular, más y más larga, pero que va tomando una pigmentación clorofílica normal. El predominio apical de la planta madre inhibe el desarrollo de los limbos del retoño durante un período que puede llegar hasta el de la cosecha de la inflorescencia. Es fácil observar que, en cuanto se corta el pseudotallo de un plátano no florido, sus retoños, casi inmediatamente producen hojas. (10)

4.1.3.4 Independencia del retoño

La aparición de la primera hoja de limbo grande o funcional es un fenómeno visible, ya que marca el comienzo de la fase de acceso a la edad adulta. (19)

Es posible que un retoño muy joven produzca pequeñas hojas cortas y anchas, de 30 por 15 cm, pongamos por caso: podemos afirmar que ha habido algún accidente que ha interrumpido los intercambios entre el cormo principal y el más pequeño de los retoños. Habiendo cesado precozmente la inhibición, el segundo deberá inmediatamente sobrevivir por sí solo y poseyendo algunas raíces forma una superficie asimiladora. Estos son los retoños de agua que carecen de valor agronómico, por cuanto vegetan muy lentamente. (10,19)

4.1.3.5 Desarrollo de la hoja

El punto meristemático da nacimiento al brote, que en un principio no es más que un capuchón de base circular, cuyo extremo termina en filamento. La porción que posteriormente será la vaina, queda muy corta, mientras que se puede diferenciar precozmente la parte peciolar y la nerviación central, terminada por el filamento que se denomina apéndice precursor. En el interior del pseudotallo, el crecimiento prosigue rápidamente, mientras que se van formando otros brotes foliares y la base de la vaina se amplía, impulsada por el desarrollo de los tejidos jóvenes del centro. La parte de la nerviación se alarga y el ala izquierda (asumiendo que se mira la cara ventral de la nerviación con el ápice en alto) comienza a cubrir el ala derecha. Cada una de estas alas crecerá en anchura para formar un semilimbo, de los que el de la izquierda da varias vueltas envolviendo la nerviación entera. Se nota que se introduce en el limitado espacio del canal peciolar de la hoja precedente. La otra ala progresará en la propia concavidad de la hoja precedente. (19)

La formación de los semilimbos, tiene lugar casi totalmente en el interior del pseudotallo; una hoja inmediatamente anterior a su salida se presenta como un rollito muy apretado, de un tejido blanquecino, extremadamente frágil. La fase de la salida de la hoja corresponde a un crecimiento muy rápido de la vaina foliar. Se distingue la parte superior del rollito, llamado frecuentemente "cornete", coronado por el capuchón que a su vez termina en filamento precursor, que se deseca y cae inmediatamente. (10)

Cuando el cornete ha salido en sus dos tercios aproximadamente, el semilimbo izquierdo enrollado exteriormente comienza a desenvolverse en forma de cuerno. La parte derecha lo hace después. La pigmentación clorofílica aparece simultáneamente y la nerviación transversal se hace visible. Apenas ha terminado este desenvolvimiento, aparece la punta del cornete siguiente en el canal peciolar de la nueva hoja. Este proceso es idéntico para toda la serie de hojas nacidas del mismo tallo. (10)

4.1.3.6 El cormo

El nuevo cormo crece poco en altura, pues los entrenudos son muy cortos, pero aumenta sobre todo en ancho. Las partes más viejas se encuentran en la base, mientras que la parte superior del cormo se agranda considerablemente según va produciendo hojas y los tejidos subyacentes del cilindro central se llenan de almidón. Se considera que el cormo juega un papel muy importante por las reservas energéticas que contiene. El aumento de volumen del cormo provoca una presión lateral contra la tierra circundante, que si es muy compacta constituye un obstáculo para su desarrollo, y por ello se ha observado deformaciones en ciertos tipos de suelos. (19)

4.1.3.7 Formación de yemas

Para darse cuenta de la posición exacta de las yemas, se han de separar dos o tres yemas de las vainas foliares más exteriores y hacerlo hasta el punto de insercción. Se sabe que en tal emplazamiento la vaina envuelve completamente al bulbo y las dos alas, muy delgadas, se reúnen formando una V, en la punta de la cual se distingue una yema poco resaltada; si se prosigue levantando cada una de las vainas sucesivas, se comprobará que a cada vaina corresponde una yema, cada vez más pequeña. El tallo verdadero diferencia tantas yemas como hojas, dispuestas unas y otras helicoidalmente. (10)

Las hojas lanceoladas de los grandes brotes llevan ya en su base yemas capaces de desarrollarse, no hay pues relación con la utilidad funcional de la hoja a la cual parece corresponder aquella yema. El segundo hecho que hay que tomar en cuenta es que toda yema posee la capacidad de desarrollarse y producir un nuevo tallo normal. Es necesario no obstante la reunión de ciertas condiciones: que no haya más rebrotes en curso de desarrollo, y por otra parte, que la yema esté separada de la cobertura de vainas que la aíslan del exterior. (10)

El plátano es de estructura monoploidal, es decir, que el cormo es propiamente el tallo principal que da ramificaciones laterales; la estructura cormosa implica, el crecimiento subterráneo del tallo aéreo. La espiral formada por los meristemas secundarios sucesivos tiene por eje una curva que es el camino recorrido por el meristema central del cormo, horizontal cuando es muy joven, este eje se endereza para hacerse vertical en su estado adulto. En el

helicóide, cuyo eje es curvo, se encuentran yemas en posición alta, media o baja, según parece, en este último caso las condiciones son más favorables para un desarrollo vigoroso. No se trata solamente de una ventaja de situación, pues si las yemas altas, están muy desfavorecidas, disponiendo de muy poco espacio en los cormos viejos, las laterales tienen espacio para engrosar, y es probable, además, que los brotes más bajos queden favorecidos por sustancias del crecimiento. (9,10)

4.1.3.8 La diferenciación floral

De acuerdo con Champion (10), la transformación que lleva al meristema a diferenciar elementos florales tiene lugar cuando la planta cuenta con la mitad de su superficie foliar en el exterior, este fenómeno tiene lugar cuando la planta ha dado cierto número de hojas funcionales.

El primer indicio de la fase floral se percibe sobre el extremo meristemático, que toma una forma cónica. Esto marca el comienzo del crecimiento del tallo verdadero, que después de haber permanecido mucho tiempo a ras del suelo, va a convertirse en aéreo, creciendo en el centro del pseudotallo, por lo general, suelen quedar todavía en el interior de éste de 10 a 12 hojas en desarrollo. Todas ellas se producirán sucesivamente antes que aparezca la inflorescencia. (10)

Según Champion (11) "durante este período los brotes florales se irán diferenciando sin cesar y continuarán su desarrollo, mientras que, simultáneamente, el tallo, con la inflorescencia terminal, se alarga para abrirse paso en medio de las últimas hojas. La última hoja es corta y ancha, con una nerviación central incompleta y agrandada; insinúa las primeras etapas que siguen, una o dos de ellas sin flores; estas vainas transformadas son más o menos ovales, acuminadas, con una nerviación longitudinal y están muy pigmentadas de antoxantinas, rojo violáceo y exteriormente cerosas. Se desecan y caen muy rápidamente; con frecuencia reciben el nombre de brácteas. Debido a su imbricación, el conjunto de las brácteas forma una gran yema ovoide. Cuando la bráctea o brácteas están vacías, se constata que cada una de ellas cubre un grupo de flores, siempre femeninas, carácter sexual que aparece muy precozmente." (10)

4.1.3.9 Desarrollo de la inflorescencia

Cardeñosa (9) refiere que la inflorescencia es un grupo de flores, dispuestas de dos hileras imbricadas y oprimidas entre la bráctea que lo recubre y la yema subyacente, y recibe el nombre de mano, y los frutos con frecuencia son llamados dedos. La inflorescencia comprende primeramente varias de estas "manos" de flores femeninas; su cantidad puede ser muy escasa si la vegetación es defectuosa; si las condiciones son óptimas, podrá llegar hasta trece o catorce, en promedio de nueve a doce manos es un buen número.

El número de frutos en una mano varía según el orden de ésta, disminuyendo ligeramente en el curso de la diferenciación; la primera aparecida, y a veces la segunda, es la que posee mayor número, pero éste será tanto mayor cuantas más manos de flores femeninas comporte el racimo. Después de que el meristema ha dado estos pocos grupos femeninos, se opera un nuevo cambio hormonal y aparecen grupos de flores masculinas, caracterizadas por su ovario reducido y estambres desarrollados. (9)

Para Champion (10), la evolución del racimo exige varias semanas. Cuando las emisiones foliares han terminado, la cadencia de desecación tomará mayor importancia; la duración de vida de una hoja varía mucho y es de cien a doscientos días. Un plátano que tenga quince hojas verdes, puede perder cuatro o cinco a la salida de la inflorescencia e incluso a veces muchas más como consecuencia de algún parasitismo o condiciones climáticas desfavorables.

En las variedades comerciales la inflorescencia no permanece erecta; la parte del eje situada inmediatamente debajo de las primeras brácteas, se curva ligeramente, por geotropismo; esto se explica mejor diciendo que el raquis no posee muchos haces fibrosos, sino principalmente conductores inmersos en un parénquima y que el peso de la yema es importante. Después de volver a la vertical las grandes brácteas, las más exteriores, de un rojo violáceo, se levantan, giran y caen rápidamente después de haberse desecado, al cabo de uno o dos días. Las manos quedan descubiertas así unas después de las otras, por su mismo orden de diferenciación. (19)

Las flores femeninas descubiertas, tienen el ápice dirigido hacia abajo y están en este momento apretadas estrechamente unas contra otras; sus ovarios son ya de gran longitud, de la mitad a dos tercios de su longitud definitiva; las piezas florales se desecarán pronto y luego irán cayendo más o menos rápidamente, pero el estigma seco puede persistir hasta la cosecha. El desarrollo del ovario se efectúa sin intervención del polen, del que, por otra parte carecen las flores masculinas de la mayoría de las variedades comerciales.

Los plátanos jóvenes inician entonces un rápido enderezamiento (una o dos semanas) hacia lo alto. Después del enderezamiento, el racimo ha adquirido ya su conformidad definitiva, lo que sucede aproximadamente unas tres semanas después que la inflorescencia haya apuntado en la parte superior del pseudotallo. Bajo las últimas manos, el tallo continúa alargándose, en dirección al suelo. La yema disminuye progresivamente de volumen; casi cada día se levanta una bráctea y se descubre una mano de flores masculinas. En las variedades gigantes estas brácteas caen pocas horas después, pero en las enanas persisten en estado de desecación durante largo tiempo. La evolución del racimo prosigue aproximadamente uno o dos meses, hasta llegar a la fase final de aptitud para la cosecha. (19)

4.1.4 Micropropagación en Musa

Para Hartman y Kester (15), la micropropagación consiste en producir plantas a partir de porciones muy pequeñas de ellas (células, tejidos u órganos), denominadas explantes, cultivadas bajo condiciones controladas de luz, temperatura y nutrición en un ambiente aséptico, utilizando medios de cultivo.

Según Pocasangre (24), es la propagación masiva de plantas a nivel in vitro con fines comerciales, ya que es el campo agrícola donde mayor impacto económico ha tenido el cultivo de tejidos.

Una característica importante de la micropropagación en masa es la tasa potencialmente alta de multiplicación de clones que puede lograrse en un tiempo relativamente corto, ya que una sola planta en cultivo y multiplicándola geométricamente a intervalos mensuales de un mes se puede predecir la producción de un millón de plantas en seis meses. (15)

El género *Musa* puede multiplicarse rápidamente mediante las técnicas de micropropagación. Los primeros reportes de su utilización proceden de China y Taiwan en 1970, pero comercialmente se inició la micropropagación en la década de los ochenta en Israel, Australia, Venezuela, Costa Rica y Sudáfrica. Actualmente Cuba, es el máximo productor de vitroplantas a nivel regional con una producción anual de 40 millones de plantas, distribuida en la red de biofábricas por todo el país. (24,26)

El principio fundamental del Cultivo de Tejidos, es el principio de Totipotencialidad, propuesto por el fisiólogo alemán G. Haberlandt, en 1902, el cual indica que no importa que tejido esté formando una célula, ésta tiene el potencial genético del individuo del que forma parte y es capaz de dar origen a un individuo idéntico. (4)

En la micropropagación de banano y plátano se han utilizado explantes provenientes de flores masculinas y femeninas inmaduras, meristemas apicales, porciones de rizomas, de hojas y embriones inmaduros. (29)

Las aplicaciones de la micropropagación son numerosas con relación a los métodos convencionales, entre ellas están (6,24):

- Propagación clonal de una variedad o cultivar.
- Posibilita multiplicar rápidamente un genotipo del cual existen pocos individuos.
- Se reduce el tiempo de multiplicación.
- Permite multiplicar grandes cantidades de plantas en poco espacio.
- Se controla la sanidad del material que se propaga.
- Permite programar la siembra del cultivo en forma escalonada, para programar la cosecha.
- Facilita el intercambio de germoplasma.
- No depende de condiciones ambientales para implementarse. (6,24)

En el caso del banano y plátano, se ha comprobado experimentalmente que el comportamiento agronómico de las plantas producidas *in vitro*, es superior a las plantas propagadas por métodos convencionales (cormos), debido a que

se ha obtenido uniformidad y sanidad en las plantaciones, precocidad a la parición, mayor tasa de emisión foliar y rendimientos superiores a las plantas propagadas por cormos. (29)

Un estudio realizado por Pérez (23) en Costa Rica, sobre el desempeño de plantas de banano Grande Naine, provenientes de cultivo de tejidos y retoños convencionales, demuestra que las primeras florecieron a los 200 días contra 316 de los segundos; la maduración de los in vitro fue a los 345 días y de los retoños a los 448; siendo el rendimiento de 123 TM/ha y 87 TM/ha, respectivamente.

La micropropagación puede presentar algunas desventajas como:

- Posibilidad de propagar enfermedades de tipo vascular o sistémico, si el propágulo inicial está contaminado y no se realizan pruebas de detección. Las principales enfermedades que afectan a las Musáceas son: *Mycosphaerella fijiensis* var. *diformis*; *Mycosphaerella musicola*; *Pseudomonas solanacearum*; *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*; el Virus del Mosaico del Cocombro (CMV, único que ha sido detectado en las Musáceas de América); el Banana Bunchy Top Virus (BBTV) y el virus del mosaico del Abacá. (4)
- Está limitada a un número determinado de subcultivos, después de los cuales empiezan a aparecer plantas fuera de tipo.
- Para implementar las técnicas de micropropagación, es necesario contar con equipo, cristalería e instalaciones adecuadas. (5)

4.1.4.1 Fases de la micropropagación

La micropropagación es un proceso que puede dividirse en cuatro fases, las cuales son:

A. Fase I: Iniciación o establecimiento

Es el primer paso en el cual se realiza la escogencia, la desinfección y el cultivo inicial del material que se quiere propagar. La función de esta etapa es establecer un explante estéril, que ha sido escogido con base en características fisiológicas como edad y su capacidad para sobrevivir el cultivo inicial y provocar la respuesta apropiada. (15,17)

Según Lee (18), los tejidos jóvenes (brotes terminales o axilares y flores inmaduras) se regeneran mejor que los maduros, y en los tejidos de órganos de almacenamiento es necesario considerar patrones de letargo estacional.

De acuerdo con Sandoval (29) esta fase tiene como objetivo acondicionar fisiológicamente al explante a las nuevas condiciones de crecimiento *in vitro*, para que éste tenga una respuesta adecuada, controlar la contaminación y evitar la oxidación por polifenoles. Esta etapa tiene una duración de aproximadamente cuatro a seis semanas, durante este período el explante crece y forma una estructura foliosa pequeña de 1-1.5 cm de largo con dos o tres hojas. Adquiere una coloración verde, aumenta en diámetro en su parte basal y presenta dominancia apical.

B. Fase II: Multiplicación

En esta etapa se pretende incrementar el número de propágulos. Los ingredientes que se adicionan al medio de cultivo en esta fase, están determinados por la clase de respuesta que se requiera, pues si lo que se necesita es la formación de brotes axilares se usarán citocininas (principalmente Bencilaminopurina) en altas concentraciones y auxinas (ácido indolacético es el más utilizado) en bajas concentraciones, y para la producción de callo, se adicionará auxina en mayores concentraciones. El medio más utilizado en *Musa*, es el de Murashige y Skoog (1962), modificado de acuerdo a las necesidades o propósitos de la investigación. (18,24)

Los explantes de la Fase I son cortados longitudinalmente en el centro y cada mitad se vuelve a sembrar en un nuevo medio de multiplicación.

Según Arias (5) la multiplicación se repite a intervalos regulares, que varían según la especie; en *Musa*, son recomendables ocho subcultivos, ya que después podrían aparecer plantas fuera de tipo.

El tamaño de los recipientes de cultivo, depende del tipo de plantas que se produzcan y del espacio requerido para la proliferación; un recipiente comúnmente utilizado y fácil de conseguir, es el que se usa para la comercialización de alimentos infantiles, conocidos como frascos Gerber. También es necesario saber escoger entre un medio sólido y un medio líquido, el primero proporciona un buen sostén y aireación, pero reduce el contacto del propágulo para la absorción de nutrientes, pero si se utiliza el segundo, es necesario mantenerlo en constante agitación para que haya oxigenación en el medio y el material no muera por asfixia; en *Musa*, el medio semisólido es el más utilizado. (15)

C. Fase III: Enraizamiento

El objetivo de esta fase es lograr que la vitroplanta desarrolle un sistema radicular y foliar funcional que le permita adaptarse a las condiciones de manejo *ex vitro*. (24)

D. Fase IV: Aclimatación

En esta etapa la plantita pasa de ser heterótrofa a autótrofa, esto implica que ésta inicie nuevas hojas después que ha sido removida del medio, por lo que se necesita conservar el brote en estado de crecimiento activo, ya que de lo contrario su establecimiento puede ser difícil, por lo que no son recomendables períodos de cultivo muy largos. (15)

También presentan susceptibilidad al ataque de organismos patógenos y sensibilidad a la escasez de humedad, esto es debido a que las hojas presentan un aspecto no glauco (lisas y brillantes) en comparación con el aspecto glauco (cerosas) de las hojas con cutícula, por lo que son sensibles a la deshidratación, aparte de que sus estomas no funcionan efectivamente, y se observan en baja densidad. (15,18)

Por eso es recomendable aumentar la concentración de agar en el medio, para mejorar la supervivencia de las plantas, principalmente las herbáceas perennes (como el plátano), para mejorar la supervivencia después del trasplante al disminuir la tasa de crecimiento y aumentar la resistencia. (15)

Si los brotes están muy diferenciados y presentan de dos a tres hojas completamente desarrolladas, es recomendable eliminar dicho follaje; ya que en el medio de enraizamiento la emisión radicular se lleva a cabo y en 22 a 30 días se tiene una adecuada proporción raíz-follaje. (29)

La aclimatación de las plantas producidas por cultivos in vitro es una de las etapas más importantes y delicadas de la micropropagación, ya que el propósito es obtener un porcentaje alto de supervivencia. (15)

La etapa de trasplante abarca la transferencia de la planta del medio aséptico al ambiente de vida natural en el invernadero y luego a campo abierto. Por lo tanto deben volverse autótrofas, tener que desarrollar raíces, brotes funcionales y aumentar su resistencia a la desecación y al ataque de patógenos. (15)

Durante las primeras tres a cuatro semanas después del trasplante es necesario mantener alta la humedad relativa (del 50% al 100%) para evitar el desecamiento y estimular la formación de brotes y raíces, pero se debe tener cuidado al utilizar sistemas de microaspersión y nebulización, puesto que se puede incrementar el contenido de humedad en el sustrato, lo cual podría propiciar niveles inconvenientes de CO₂ y O₂, que a la vez podrían inhibir el crecimiento. Es importante que el suelo esté esterilizado, que ofrezca buen drenaje y aireación para que las raíces se desarrollen con rapidez. (15,29)

Sandoval (29), refiere que la primera hoja inicia su emergencia a los ocho días después de haber realizado el trasplante, el follaje desarrollado in vitro es transicional y se atrofia. El ritmo de emisión foliar es aproximadamente de una hoja por cada ocho días.

4.1.4.2 Problemas en la micropropagación

Para Lee (18), en todas las fases de la micropropagación pueden presentarse problemas de distintos tipos. Los más comunes son:

A. Contaminación

La contaminación provoca cuantiosas pérdidas en la micropropagación masiva y hace ineficientes económicamente algunos procesos. La contaminación en cultivo de tejidos puede originarse de dos fuentes (18):

- a. Por microorganismos que son llevados en la superficie o en los tejidos del explante.
- b. Por procedimientos defectuosos en el laboratorio.

a. Contaminación por microorganismos

Los contaminantes patógenos pueden ser externos o internos. Los primeros, también llamados exógenos, se encuentran en todas partes, en el aire, en la superficie de las plantas, en el mobiliario y en las manos, entre otros. Las esporas de estos organismos se mueven en las corrientes de aire, sobre partículas de polvo. Los microorganismos internos, sistémicos o endógenos, son los que se encuentran en el interior del tejido del explante, ya sea en espacios intercelulares o intracelulares. (15)

Dentro de los microorganismos que se describen como contaminantes del cultivo de tejidos, se incluyen virus, bacterias, hongos, levaduras, ácaros y trips. La contaminación por bacterias y hongos es considerada el problema más serio. Los ácaros y los trips y algunas veces las hormigas, no producen daño directo al cultivo, pero pueden introducir otros contaminantes como hongos, levaduras y bacterias. (18)

La contaminación causada por hongos y bacterias en la mayoría de los casos es visible, dado que hay un crecimiento de los microorganismos sobre el explante o en los medios de cultivo, que se observan en la base de los explantes

como un halo de color blanco o exudados amarillos con posterior necrosis. Es fácil detectar este tipo de contaminación durante los primeros cuatro días del cultivo, lo recomendable al detectarla es la eliminación del material, puesto que su control es difícil. Sin embargo, algunas bacterias no producen un crecimiento visible, pueden permanecer latentes y empezar los síntomas luego de un prolongado tiempo en el medio de cultivo. Las bacterias que comúnmente se encuentran en instrumentos o medios de cultivo son los *Aerococcus* sp. y *Bacillus* sp. (18,29)

Para obtener buenos resultados en la micropropagación, Sandoval (29) recomienda mantener controlada la contaminación en un rango del 10-20%.

Existen métodos de evaluación sanitaria para determinar la contaminación de microorganismos, principalmente sistémicos o vasculares, en el explante inicial o en las plantas donadoras de éste, tales como la prueba de ELISA, y la serología de doble difusión, entre otros, que se utilizan en la detección de virus y bacterias. (4)

También es factible combatir los microorganismos utilizando productos químicos desinfectantes como el hipoclorito de sodio, el hipoclorito de calcio o el alcohol o sustancias bioactivas como el PEG6000 (2-5(bromuro-2-furil)-1-bromo-1-nitro-etano) un subproducto de la industria azucarera, que fue desarrollado en Cuba y está siendo evaluado en varios países de América Latina. También es utilizada la termoterapia, es decir, esterilización a través de calor. (26)

b. Procesos defectuosos en el laboratorio

Si algún procedimiento es realizado defectuosamente es muy probable que incida en consecuencias negativas en el cultivo de tejidos, tal es el caso de (18,24):

- Fallas en la esterilización del medio de cultivo e instrumentos de disección.
- Fallas en la desinfección superficial aplicada al material vegetal a trabajar.
- Falta de condiciones asépticas de la cámara donde se realizan los cortes e inoculación del material vegetal.
- Fallas de refrigeración y/o ventilación en el cuarto de crecimiento.

- Dispersión de contaminantes por parte del hombre, tales como, micrococcus y estafilococcus, a los medios y/o explantes.
- Errores cometidos por el operario al momento de realizar el corte y la inoculación del material.

B. Oxidación

La oxidación de los cultivos in vitro es causada por la liberación de fenoles al medio de cultivo, que reaccionan con el oxígeno del frasco y producen coloraciones rojas, amarillas y en casos avanzados café oscuro. Estos compuestos fenólicos son exudados por la herida del tejido dentro del medio, son atrapados por el agar y acumulados formando un área negra alrededor del explante, resultando en una inhibición del crecimiento. (24)

Pocasangre (24) refiere que el café característico de la oxidación, llamado ennegrecimiento del trasplante, se debe a que las enzimas monofenoloxidasas (tirasinadas) y la polifenol oxidasas (catecoloxidasas) oxidan los fenoles dando como resultado quinonas.

Lee (18) hace las siguientes propuestas para impedir el ennegrecimiento del género *Musa*:

- Polivinilpirrolidone (PVP).
- Modificando el potencial redox, a través de agentes reductores o con menor disponibilidad de oxígeno.
- Inactivando las enzimas fenolasas.
- El control más efectivo, son los subcultivos frecuentes y la eliminación de tejidos que se encuentran casi muertos y por lo general se localizan en la base de los brotes.

Es posible también utilizar antioxidantes químicos, pero no todos son efectivos, por ejemplo, el ácido ascórbico es conveniente usarlo por cortos períodos, porque muy rápidamente se vuelve un oxidante fuerte; o sumergir los explantes en soluciones de Cisteína HCl. (22)

Las principales fuentes de oxidación son el tipo de material que se utilice, ya que incluso dentro de una misma especie hay distintos grados de oxidación, y otra, es una defectuosa desinfección superficial del material que es llevado al laboratorio. (29)

C. Número de subcultivos

Para cada especie, la frecuencia y la susceptibilidad de producir plantas fuera de tipo es una consecuencia de la reacción del explante a cambios con el tiempo en el cultivo y/o el número de subcultivos. (5)

Según Orozco (21) en la mayoría de las especies, después de que han sobrepasado el número de subcultivos determinado para ellas, se manifiesta el fenómeno de variación somaclonal, que puede ser temporal (epigenética) o estable. Estas variaciones se manifiestan como mutaciones heredables a las progenies de las plantas regeneradas, estas plantas son fenotípicamente distintas a las progenitoras. Aunque el origen de la variación somaclonal no está claro, se considera que el principal mecanismo que lo genera es un reordenamiento cromosómico, aunque otras razones podrían ser: un entrecruce somático, un intercambio de cromátidas hermanas, una alteración de los nucleótidos o una perturbación de la réplica del ADN por culpa de genes por mutaciones ocurridas en regiones no codificadas.

Arias (5) refiere que en el caso del género *Musa*, otros factores que determinan la variación somaclonal son:

- La regeneración de plantas a partir de callo incrementa la variación en comparación con los ápices meristemáticos.
- Diferencias entre cultivares.
- Número de subcultivos. La frecuencia de variación aumenta a medida que se incrementan los ciclos de multiplicación del material propagado. Se ha determinado que no se deben realizar más de ocho subcultivos.
- Si se utilizan concentraciones mayores de cinco miligramos por litro de Bencilaminopurina (BA) se corre el riesgo de provocar la variación.
- El estado fenológico de la planta donadora influye en la aparición de variantes somaclonales, por lo que se recomienda que los explantes provengan de plantas sanas y vigorosas.

Actualmente, la aplicación de la variación somaclonal es para incorporar nuevas características deseables a una variedad. En Taiwan, se seleccionó una variante somaclonal del banano "Giat Cavndish" que demostró resistencia a la marchitez causada por Fusarium oxisporum raza 4. (35)

El plátano presenta un porcentaje de mayor variación somaclonal que el banano, algunas variaciones son (5, 29):

- Variación en la altura de la planta (enanismo y gigantismo)
- Anormalidades en las inflorescencias y frutos
- Variación en la presentación de hojas y pseudotallos
- Disposición de hojas pédulas (caídas) o en forma de "roseta".

Sin embargo, el tipo de variante más común es el enanismo que representa el 80% del total de la variación.

D. Vitrificación

La vitrificación es un fenómeno fisiológico que puede causar serios daños en la fase de multiplicación, consiste en el aumento del potencial hídrico de las células que causa el enverdecimiento de los tejidos y los vuelve quebradizos. Este desorden, afecta la fotosíntesis y el intercambio de gases por las hojas y más tarde impide el establecimiento ex vitro de plantas micropropagadas. (24)

4.1.4.3 Medios de cultivo utilizados en Musa

El éxito del cultivo in vitro de cualquier especie depende en gran medida de la escogencia del medio de cultivo en el cual se siembre. Esto incluye la composición química y física así como el balance entre los nutrientes y los reguladores del crecimiento. En general todo medio de cultivo debe contener los elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de la planta, sin embargo, los medios nutritivos usados para cultivo de células, tejidos y órganos necesitan de requerimientos específicos. Fundamentalmente un medio de cultivo contiene (28):

A. Agua

Se debe prestar mucha atención a la calidad del agua ya que ésta constituye el 95% del medio nutritivo, por lo que se debe utilizar agua destilada. (28)

B. Nutrientes minerales

Lee (18) refiere que cualitativamente los nutrientes inorgánicos de una planta en cultivo de tejidos son los mismos requeridos por una planta normal, por lo que a los medios de cultivo se les aportan los mismo elementos (macro y micronutrientes) que se consideran esenciales para el crecimiento de plantas enteras. Los macronutrientes adicionados a los medios son requeridos en cantidades milimolares y son: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). Según sean los propósitos, un medio puede contener de 25 a 60 mM de estos nutrientes. El amonio varía entre dos y 20 milimoles, concentraciones mayores de ocho milimoles pueden reducir el crecimiento. El potasio es generalmente suplido como nitrato o cloruro. La concentración óptima de fósforo (P), magnesio (Mg), calcio (Ca) y azufre (S) bajo condiciones donde los otros requerimientos son satisfactorios para el crecimiento celular varía de uno a tres milimoles. Los micronutrientes necesarios son requeridos en concentraciones micromolares e incluyen: hierro (Fe), zinc (Zn), boro (Br), manganeso (Mn), molibdeno (Mb), cobre (Cu) y cobalto (Co). El hierro (Fe) es suplido como quelato con EDTA (ácido etilendiamino-tetra-acético). Las células de las plantas toleran altas concentraciones de cloruro y sodio, y estos no tienen un efecto aparente en la tasa de crecimiento.

C. Vitaminas

La mayor parte de las plantas son capaces de sintetizar vitaminas *in vitro*, es probable que en forma general solo sea necesario incorporar al medio la Tiamina; aunque, generalmente se adicionan la Piridoxina-HCl y el ácido nicotínico. El myo-inositol, que es un carbohidrato, es considerado como vitamina porque no puede ser utilizado como una sola fuente de carbón energético y es agregado al medio para estimular el crecimiento. El inositol no es esencial, pero la adición de 100 mg por litro mejora el crecimiento celular. (18,28)

D. Azúcares

Son componentes muy importantes en cualquier medio nutritivo y son esenciales para el crecimiento y desarrollo in vitro, ya que el primero tiene lugar en condiciones poco apropiadas para la fotosíntesis o incluso en la oscuridad. Los tejidos verdes no son suficientemente autotróficos in vitro, y requieren de una fuente de carbohidratos para obtener la energía necesaria para su crecimiento y desarrollo. Los azúcares están involucrados en los procesos de diferenciación celular favoreciendo la formación de elementos vasculares y la clorofila en las plantas. Generalmente, se usa una concentración de 1-5% de sacarosa, ya que este azúcar se sintetiza y se transporta de forma natural por las plantas. (18)

También se puede utilizar glucosa y fructosa, que son monosacáridos, como sustitutos de la sacarosa. (28)

E. Nitrógeno orgánico

Una fuente común de nitrógeno orgánico incluye aminoácidos, como la L-tirosina, que, aunque no es necesaria, beneficia la síntesis de proteína. La adición de Sulfato de Adenina al medio, ayuda a la morfogénesis. (18)

F. Agar

El agar es un polisacárido de elevada masa molecular, que tiene capacidad para gelificar los medios, y puede retener el agua, pero si su concentración es muy alta puede afectar en forma negativa el crecimiento y desarrollo de la planta, por lo que es recomendable usar la cantidad necesaria. (28)

El uso del Phytágel como agente gelificante permite detectar tempranamente los microorganismos o agentes contaminantes gracias a su aspecto transparente. (28)

G. pH

El pH influye de manera determinante en los medios de cultivo, ya que un pH menor de 4.5 o mayor que siete, frena el crecimiento y desarrollo in vitro. Si el pH es demasiado bajo, pueden presentarse las siguientes complicaciones:

- La auxina AIA (ácido indolacético) y el ácido giberélico (AG) se hacen menos estables.
- El agar pierde rigidez.
- Algunas sales (fosfato y hierro) pueden precipitarse.
- Se retarda la absorción de iones amonio. (28)

4.1.4.4 Reguladores del crecimiento

Algunos químicos se encuentran naturalmente en los tejidos de las plantas, y tienen una función reguladora, además de nutricional, en el crecimiento y desarrollo de la planta; estos compuestos que son generalmente activos en concentraciones muy bajas son conocidos como sustancias de crecimiento de las plantas (u hormonas de las plantas). Los químicos sintéticos con actividades fisiológicas similares a las sustancias de crecimiento de las plantas o compuestos que tienen la habilidad de modificar el crecimiento de las plantas por otros medios, son usualmente definidos como sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas. Algunas de las sustancias de crecimiento naturales son preparadas sintéticamente a través de procesos de fermentación. (36)

Para Hartman (15) las auxinas y citocininas son, por mucho, las más importantes para regular el crecimiento y la morfogénesis en el tejido de las plantas y en el cultivo de órganos, para ellas, reguladores sintéticos han sido descubiertos con una actividad biológica que iguala o excede la de las sustancias de crecimiento equivalentes. No hay alternativas químicas para las giberelinas naturales, las cuales son extraídas de hongos cultivados y se utilizan como reguladores exógenos.

Los efectos de los reguladores del crecimiento, no son absolutos y específicos. Las respuestas de las células, de los tejidos y órganos *in vitro* pueden variar de acuerdo con las condiciones del cultivo, el tipo de explante y el genotipo de la planta. (36)

Frecuentemente, una combinación de dos o más compuestos de diferentes clases es necesaria, ya sea aplicados de forma simultánea o secuencial, y hay generalmente un período de retraso antes de que el efecto del tratamiento sea evidente. (13)

Para Bidwell (8), las hormonas son por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo, que actúan generalmente en áreas diferentes a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades.

También se han desarrollado otro tipo de hormonas sintéticas que pueden tener un efecto semejante a las naturales. Al conjunto de estos productos sintéticos, junto con las hormonas naturales se les denominan reguladores del crecimiento. A continuación se describen los principales tipos de reguladores del crecimiento que son de utilidad en el cultivo de tejidos en plátano (*Musa balbisiana* Colla). (36)

A. Auxinas

Las auxinas son sustancias que participan en la elongación y división celular. Las concentraciones recomendadas son de 0.1 a 10 mg/l. Dentro de las auxinas más utilizadas en la micropropagación de *Musáceas* son, el ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (AIB), el ácido naftalenacético (ANA) y el 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), utilizadas principalmente en la fase de regeneración para estimular la formación de raíces. (24)

Por lo general, en la preparación de un medio de cultivo se utiliza solamente un tipo de auxina, sin embargo, en algunos casos se utilizan combinaciones. El uso excesivo de auxinas puede provocar la llamada habituación de los tejidos *in vitro* y ya no se estimula el crecimiento de las plantas a las aplicaciones exógenas de éstas. (18)

La función biológica de las auxinas se orienta a la expansión de las células del tallo y coleóptilos, también cumplen funciones de división celular y fomentan el desarrollo de callos. Aumentan la flexibilidad de las paredes, disminuyen la presión de ésta alrededor de la célula, y la presión de turgencia causada por las fuerzas osmóticas en la savia vacuolar hace que el agua entre a las células, provocando su expansión. (36)

Se sintetizan característicamente en el ápice de tallo (en el meristema terminal o cerca de él) y en tejidos jóvenes (p.e. hojas jóvenes) y se mueven principalmente hacia abajo del tallo. (13)

Las máximas concentraciones de auxina se encuentran en los ápices en crecimiento, es decir, en la punta del coleóptilo, yemas y en los ápices en crecimiento de las hojas y las raíces, sin embargo, se encuentran también auxinas ampliamente distribuidas por toda la planta, sin duda alguna procedentes de las regiones meristemáticas. La concentración de auxina desciende a medida que pasamos desde el ápice a la base del coleóptilo, de modo que el contenido máximo se localiza en el ápice y el mínimo en la base. Continuando desde la base del coleóptilo en dirección al ápice de la raíz, encontramos un leve aumento del contenido en auxina, hasta llegar al punto máximo correspondiente al ápice de la raíz. Sin embargo, la concentración de auxina que se encuentra en este punto no llega a ser en ningún momento comparable a la que se encuentra en el ápice del coleóptilo. (13)

El transporte de la auxina es polar, basípeta, es decir desde el ápice hasta la base. Solamente un tercio del transporte es acrópeta, o sea, de la base al ápice. (8)

B. Citocininas

Las citocininas producen solamente efectos menores cuando se aplican a plantas intactas, pero se ha notado que estimulan la síntesis protéica. Es por esta razón, que ellas pueden promover la maduración de cloroplastos y retrasar la senescencia de hojas sueltas. La aplicación de citocininas en una sola parte de la planta, por ejemplo una hoja, causa que el órgano tratado se vuelva un sitio activo de aminoácidos, los que luego emigran al órgano desde ubicaciones que están alrededor del mismo. El efecto de citocininas, es más notable en los cultivos de tejidos, en donde frecuentemente se usan con las auxinas para estimular la división celular y controlar la morfogénesis. Si se

agregan al medio de cultivo de brotes, éstos compuestos vencen la dominancia apical y liberan los brotes laterales de la dormancia. (24)

Las citocininas naturales como la zeatina y el Zip también son usadas en la investigación, aunque no se emplean rutinariamente en los laboratorios comerciales por su costo. Afortunadamente, varios químicos análogos de las citocininas naturales, aparte de la cinetina, se ha preparado, y se ha probado que son altamente activos como las citocininas, y son principalmente sustitutos de los derivados de las adeninas. (18)

Las citocininas sintéticas utilizadas comúnmente en la micropropagación son (18):

- Cinetina 6-furfurilaminopurina
- BA 6-bencilaminopurina.

La forma de acción de las citocininas en las plantas es incierta. Se ha encontrado que algunas están presentes en las moléculas que transfieren ARN, pero aún no está claro si la incorporación de t-ARN es necesaria antes que los efectos típicos de la citocinina sean aparentes. En algunas circunstancias, se ha demostrado que las citocininas activan la síntesis de ARN y estimulan la síntesis proteica y la actividad de las enzimas. (13)

Las citocininas parecen estar implicadas en el metabolismo del azúcar. Se ha reportado tanto las disminuciones como los aumentos en la actividad específica de las enzimas de las rutas de pentosa y fosfato glicolíticos y oxidativos. (8)

En cultivo de tejidos, las citocininas parecen ser necesarias para la división celular, en su ausencia la metafase, pero no la profase de la mitosis, es considerablemente prolongada. También son utilizadas para el incremento de brotes axilares y la reducción de la dominancia apical. El éxito en el tratamiento, induce el crecimiento de muchos y pequeños brotes de cada explante, después de cuatro a seis semanas. La formación de brotes adventicios, ya sea directamente del explante o indirectamente a través de la formación de callo, es regulado por la interacción entre auxinas y citocininas. (18)

Según Pocasangre (24), altas concentraciones de citocininas (0.5-10 mg/l) generalmente inhiben o retrasan la formación de raíces y también previene el crecimiento de éstas y promueve el efecto de las auxinas en la iniciación de raíces. Por ésta razón, las citocininas son usualmente omitidas en la Fase III (Regeneración) de la micropropagación. Ovalle (22), al utilizar seis miligramos por litro de BA (Bencilaminopurina) en micropropagación de plátano, observó la muerte de los explantes por una intoxicación por exceso de hormona. Esta intoxicación se puede dar, porque las citocininas, aceleran la síntesis de ADN, es decir, al aplicar una dosis demasiado alta, hay una desmesurada aceleración de su metabolismo por lo que la célula ya no es capaz de sintetizarla. Por otro lado, las citocininas desactivan ciertas enzimas tales como la ARNasa, Peptidasa y ADNasa, que combinado con una aceleración en la síntesis del ADN, la cual necesita las enzimas para realizar esta síntesis, provoca la muerte de las células que ya no pueden realizar sus funciones adecuadamente. (24)

Las citocininas son producidas continuamente en las raíces, se sintetizan principalmente en los ápices radiculares; y son transportadas por el xilema al tallo y resto de la planta, aunque también se conducen a través del floema, y este transporte puede ser tanto de órgano a órgano como de raíz a tallo o viceversa, cabe la posibilidad de un reciclado o circulación de citocininas. (8)

4.1.5 Cultivo de ápices meristemáticos

Para Sandoval (29), el meristema es un tejido compuesto por células que se dividen rápidamente (células meristemáticas) y constituye un punto activo de crecimiento de la yema vegetal. Para la propagación de cultivo de plátano, el meristema es ideal como material inicial ya que tiene dos características favorables (24, 29):

- El meristema aislado se desarrolla en el medio de cultivo de una manera genéticamente estable. Este no es el caso, por ejemplo, de los cultivos de callos, que son desorganizados y presentan importantes variaciones genéticas.
- El aislamiento de meristemas reduce el nivel de infección virótica en el tejido y, bajo condiciones apropiadas, puede ser utilizado para una erradicación completa de patógenos.

La cúpula de la yema apical contiene las células verdaderamente meristemáticas y está rodeada por primordios foliares y hojas primarias. Como los tejidos vasculares más diferenciados se encuentran alejados del meristema, los elementos vasculares de los primordios foliares todavía no han estado en contacto con la parte principal del sistema vascular del tallo. De ahí, que las partículas de virus, que puedan estar presentes en el sistema vascular, llegan a la región meristemática del ápice solamente mediante un movimiento de célula. El aislamiento bajo condiciones asépticas del ápice meristemático, y su cultivo en un medio aséptico adecuado, conduce el desarrollo de plántulas. Este desarrollo, en general, sigue un modelo similar al de la planta entera: las células del meristema se dividen y la diferenciación de los tejidos continúa. La nutrición de la parte disectada de la planta es suplida por un medio artificial. (29)

Sandoval (29) reporta que "desde el punto de vista botánico este explante debe considerarse como ápice y no como meristema, lo cual implicaría realizar la disección de explantes muy pequeños, los que debido a su tamaño presentan mas exigencias nutricionales y a la vez mostrarían poca capacidad de regeneración, antes de ser transferidos al medio de iniciación. En este procedimiento se separa como explante la parte de la punta del tallo, que será el domo meristemático y unas cuantas hojas subtendientes, visibles solamente con microscopio".

Este explante es sembrado en un medio de cultivo con cantidades adecuadas de reguladores del crecimiento, y mantenido en condiciones ambientales controladas, que de acuerdo con Leon (17) son:

- Fotoperíodo: 16 horas de luz y ocho de oscuridad
- Intensidad lumínica: 1000 Lux
- Temperatura: 26-28 grados centígrados
- Humedad Relativa: 60-70%"

Este explante producirá determinado número de brotes que luego se transformarán en plantas. Pero si el meristema es decapitado, se rompe la dominancia apical y se induce a la formación de un número mayor de brotes, incrementando la eficiencia de la propagación. (17)

4.1.5.1 Bases fisiológicas del cultivo de ápices meristemáticos

A continuación se describen algunos aspectos relacionados con la anatomía y fisiología de los ápices meristemáticos.

A. Tejido meristemático de crecimiento

Para Stevenson (32) el tejido meristemático interviene sobre todo en la producción de nuevas células y se caracteriza por su inmadurez persistente. Pequeñas masas de tejido meristemático están situadas cerca de los ápices de las raíces y en las yemas de los vástagos. Debido a la posición terminal ocupada por estos tejidos juveniles se les designa como meristemas apicales. La actividad de los meristemas apicales es la que produce en gran parte el aumento longitudinal de las raíces y los retoños. La planta puede considerarse como un eje dividido en la raíz y el tallo al que se unen las hojas como apéndices. El crecimiento del eje de la planta se efectúa en los ápices o puntas de tallo y raíz.

Bidwell (8) refiere que los principales meristemas son puntas de tallos, raíces y todos los órganos rameales en crecimiento, y éste es continuo durante toda la vida de la planta ó sus órganos. El meristema apical es una estructura muy pequeña, en general de no más de un milímetro de diámetro.

Los meristemas apicales producen los tejidos originales o primarios en raíces, tallos y hojas, y se denominan tejidos primarios. El incremento en el diámetro del eje se debe al depósito de tejidos adicionales del meristema lateral, formados sobre los tejidos primarios. Por lo tanto, los tejidos formados de meristemas laterales se designan con tejidos secundarios.

B. Crecimiento apical

El crecimiento apical se desarrolla de la siguiente forma: la punta del tallo casi siempre está ocupada por un meristema apical, protegido por hojas jóvenes en desarrollo que se extienden de abajo hacia arriba y lo rodean. A medida que éstas hojas se expanden y se alejan del tallo conforme maduran, el meristema apical progresivamente forma nuevas hojas jóvenes y éstas a su vez, protegen el punto de crecimiento antes de madurar. El crecimiento en longitud es

consecuencia de las divisiones de las células que se efectúan en y cerca del meristema apical, seguidas del crecimiento de aquellas que no permanecen meristemáticas. Las hojas se originan del meristema apical de un tallo, apareciendo primero como meros abultamientos (el primordio foliar) sobre el meristema apical, un poco debajo de la punta. Las yemas axilares también se forman del meristema apical, por lo general, después de la formación de los primordios encerrados en ellas. Algunas veces el origen de las yemas axilares se retarda tanto que se desarrollan esencialmente de tejidos maduros primarios del tallo justo arriba de la hoja. (8,12)

En potencia, cada yema axilar constituye la yema terminal de un nuevo brote rameal. A veces la yema continúa su crecimiento sin interrupción, desarrollándose de inmediato para formar una rama con hojas u otro tipo de brote modificado (como una flor). Con mayor frecuencia, la yema se vuelve latente después de haberse desarrollado hasta una longitud que por lo común no llega a un centímetro. Así puede quedar en estado de latencia de modo permanente, o tarde o temprano reasumir su crecimiento dependiendo de la especie y las condiciones ambientales. El número de ramas axilares de una planta muy raramente presenta algo más que una fracción del número total de yemas axilares. (32)

C. Dominancia apical

De acuerdo al patrón de crecimiento, la punta del tallo que tiene hojas jóvenes, inhibe tanto el brote de yemas laterales del tallo, por debajo del ápice, como el crecimiento subsiguiente de las ramas laterales, este fenómeno se conoce con el nombre de dominancia apical. (8)

Stevenson (32) refiere que mientras la yema terminal está presente, las yemas laterales suelen desarrollarse lentamente o permanecen latentes. Una planta con fuerte dominancia apical tiene pocas ramificaciones o ninguna, como el girasol; la dominancia apical débil da por resultado un aspecto frondoso, con numerosas ramas laterales, como sucede con las plantas de tomate.

Según Devlin (13) en este fenómeno fisiológico, interactúan dos hormonas vegetales: las auxinas y las citocininas. La dominancia apical es causada por la auxina que se difunde a partir de la yema apical e inhibe el crecimiento de las

ramas laterales. La influencia de la yema apical sobre el crecimiento de las yemas laterales es fácil de demostrar con la simple separación de ésta de la planta. En ausencia de la yema apical empieza el crecimiento activo de la yema lateral. Sin embargo, un corto tiempo después la yema lateral más próxima a la yema apical impondrá su dominancia sobre el resto de las yemas, logrando que continúen inactivas. Si el ápice es suprimido, las yemas laterales quedan liberadas, pero sí al ápice o tallo decapitado se le aplica auxina se restablece la dominancia apical.

El aumento de citocininas libera a las yemas laterales de la dominancia apical, aún con la presencia de auxinas, esto se ha comprobado, aplicando directamente citocininas a la yema lateral que inicia su crecimiento. (8)

D. División celular

Stanfield (31) refiere "que todas las células somáticas de un organismo multicelular son descendientes de una célula precursora, la cigota, por medio de un proceso de división denominado mitosis; la función de ésta consiste en distribuir el material genético de la célula madre, en conjuntos idénticos para cada una de las células hijas. La división mitótica consta de cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase. La interfase es el período que transcurre entre dos divisiones celulares sucesivas. Cuando la célula ya se encuentra en etapa de mitosis, cada molécula de ADN ya ha replicado el material genético; es decir, ha formado una copia exacta de sí misma. Este proceso de copiado produce un cromosoma con dos filamentos muy largos en forma de gránulos de cromatina. En la profase los cromosomas se enrollan, acortan y engrosan, debido a la adición progresiva a su masa de una matriz protéica; al final de esta fase se pueden observar las dos cromátides idénticas. Los centriolos emigran hacia los extremos opuestos de la célula y establecen los polos mitóticos, a partir de los cuales se organizan fibras del huso acromático que se extiende hacia las centrómeras. La membrana nuclear comienza a degenerar y en la etapa de metafase se desintegra completamente. Los centrómeros se dirigen al centro de la célula, hasta una posición llamada plano ecuatorial o placa de metafase, y se organizan totalmente las fibras del huso, recibiendo el nombre de huso acromático. La anafase comienza cuando el centrómero se separa en dos, lo que permite que cada cromátide hermana se aleje hacia el polo opuesto de la otra conducida por su respectiva centrómera. En esta etapa, ya se puede designar arbitrariamente a las cromátides hermanas separadas como nuevos cromosomas. Los brazos de cada cromosoma son arrastrados, lo que les da formas características dependiendo de la localización de la centrómera. Los cromosomas metacéntricos adoptan forma de V,

los submetacéntricos la de J y los telocéntricos la de varilla. En la *telofase*, se concentra un grupo idéntico de cromosomas en cada polo de la célula. Los cromosomas empiezan a desarrollarse y vuelven a un estado de interfase. El huso se integra y se forma una nueva membrana nuclear, dividiéndose el citoplasma en un proceso denominado *citocinesis*. La citocinesis, en la mayor parte de las plantas, implica la construcción de una pared celular, dando por terminado este proceso celular. Dependiendo del lugar o plano de citocinesis por donde la célula fue comprimida. De esta manera, aunque que no es segura una distribución equitativa de los componentes citoplasmáticos a las células hijas, normalmente estas contienen exactamente el mismo tipo de cromosomas, y posee, exactamente la misma constitución genética”.

E. Estudio histomorfológico de la proliferación de brotes

Este estudio fue realizado por Vuylsteke et al (35) al en el Instituto Internacional de Agricultura Tropical, en la localidad de Onne, Port Harcourt en Nigeria. A continuación se describe por menores de estudios morfológicos e histológicos de la proliferación *in vitro* de brotes de yemas iniciados a partir de la excisión de un meristemo apical en *Musa*:

a. Proliferación de yemas

“Con los explantes inoculados en un medio de proliferación de brotes ocurre la supresión de la elongación, y múltiples yemas son producidas. Considerables diferencias son notadas entre cultivares en una proporción que puede estar unida a la configuración del genoma de los respectivos cultivares, como poseer dos genomas BB, que indujeron una gran proliferación. Una clara diferencia fue también observada entre triploides AAA y los cultivares con uno o dos genomas B, en el tipo de proliferación del crecimiento. En lo anterior, la proliferación de yemas ocurre por la formación de dos a seis pequeños brotes, alrededor de cuatro a seis semanas de un solo explante de meristema. Estos se elongan y forman hojas adicionales. En comparación, la proliferación en cultivares ABB o AAB implica la aparición de un grupo de numerosos brotes blancos y carnosos, estructuras de dos a cinco milímetros de diámetro, ocasionalmente envueltas por un primordio foliar verde. Estas pequeñas estructuras soportan alrededor de 2-10

diminutos meristemas dispersados sobre su superficie. La proliferación de brotes puede ser mantenida por subdivisión y transferencia de las yemas a un medio fresco de proliferación cada siete u ocho semanas”.

b. Origen y desarrollo de los brotes

El tejido es fijado en FAA (formaldehído: ácido acético glacial etanol 5:5:90) por dos horas, deshidratado directamente en series de ethanol-tertiary-butanol y envueltos en parafilm encerado. Secciones de aproximadamente ocho milimicras de espesor son cortadas con microtomo, y fijadas en portaobjetos y teñidas con safranina-rápida verde.

El proceso puede ser dividido en dos fases; la primera de inoculación y la segunda después de subcultivar.

i. Primera fase

Vuysteke (35) observó que “después de cuatro semanas de que el meristema ha estado en el medio de proliferación, una serie de bultos cónicos de hojas se ha formado, pero no extendido. Removiendo la hoja mas exterior se expone el tejido mas oculto, en el que se hacen visibles un número de meristemas muy pequeño. Estos son arreglados en forma semicircular al primordio foliar circundante. Cada uno de los nuevos meristemas formados, los cuales están unidos a la base extendida del primordio foliar central, pueden ser separados con éxito e inducidos a proliferarse. Removiendo el segundo primordio foliar se manifiestan más meristemas extremadamente pequeños, originados de un cojín meristemático blanco, el cual se formó por la rápida expansión de la hoja basal situada más adentro. En algunos explantes, una tercera zona de formación de brotes meristemáticos puede ser hallada entre el último primordio foliar. Sin embargo, estos brotes disminuyen marcadamente en número y tamaño. En algunos explantes, el desarrollo de un patrón diferente fue observado. Una sola estructura parecida a un bulbo blanco de tres a seis milímetros de tamaño, se forma deliberadamente en el primordio foliar más alejado. Esta estructura bulbosa soporta un número de pequeños meristemas, distribuidos sobre su superficie. En esta etapa tardía, estas protuberancias a menudo traspasan directamente la cubierta del primordio foliar”. (35)

ii. Segunda fase

En esta fase Vuylsteke (35) afirma que "poco después del subcultivo, las células superficiales de cada domo meristemático empiezan a dividirse muy rápido en una dirección anticlinal, resultando en la formación de un domo apical ancho y plano. Las células de esta región son pequeñas y compactas, llenas de citoplasma, que tiene un núcleo largo con nucleolos conspicuos".

"En comparación, muchas de las células que están bajo la zona de diferenciación, no tomarán parte en el proceso de proliferación meristemática. Esta segunda zona, puede ser responsable del proceso de ennegrecimiento del tejido. El primordio foliar envuelve al meristema apical durante el tiempo del subcultivo, también empieza a expandirse radialmente por rápidas divisiones anticlinales y eventualmente toman una figura irregular. Esta elongación es completamente inhibida. Un claro arreglo en espiral podría ser igualmente detectado en esta etapa. La forma filotáctica es más bien compleja, a pesar de que el punto de inserción de la hoja es una espiral arreglada alrededor del eje". (35)

La próxima etapa en la secuencia de la proliferación de brotes es la aparición de crestas y lóbulos de células meristemáticas compactas en la superficie de la zona meristemática, dándole una apariencia ondulatoria, tal como se observa en la figura 2; finalmente se localiza el primordio foliar limpio de protuberancias en los lados de cada nuevo brote formado.

4.2 Marco Referencial

4.2.1 Propagación en Musáceas

León (19) refiere que la propagación tradicional del plátano es por la vía asexual o vegetativa, ya que son estériles y no producen semillas. Los materiales que se utilizan en la propagación de *Musáceas* son:

- cormos de plantas maduras que ya han fructificado

CULTIVO DE MERISTEMOS EN MUSA

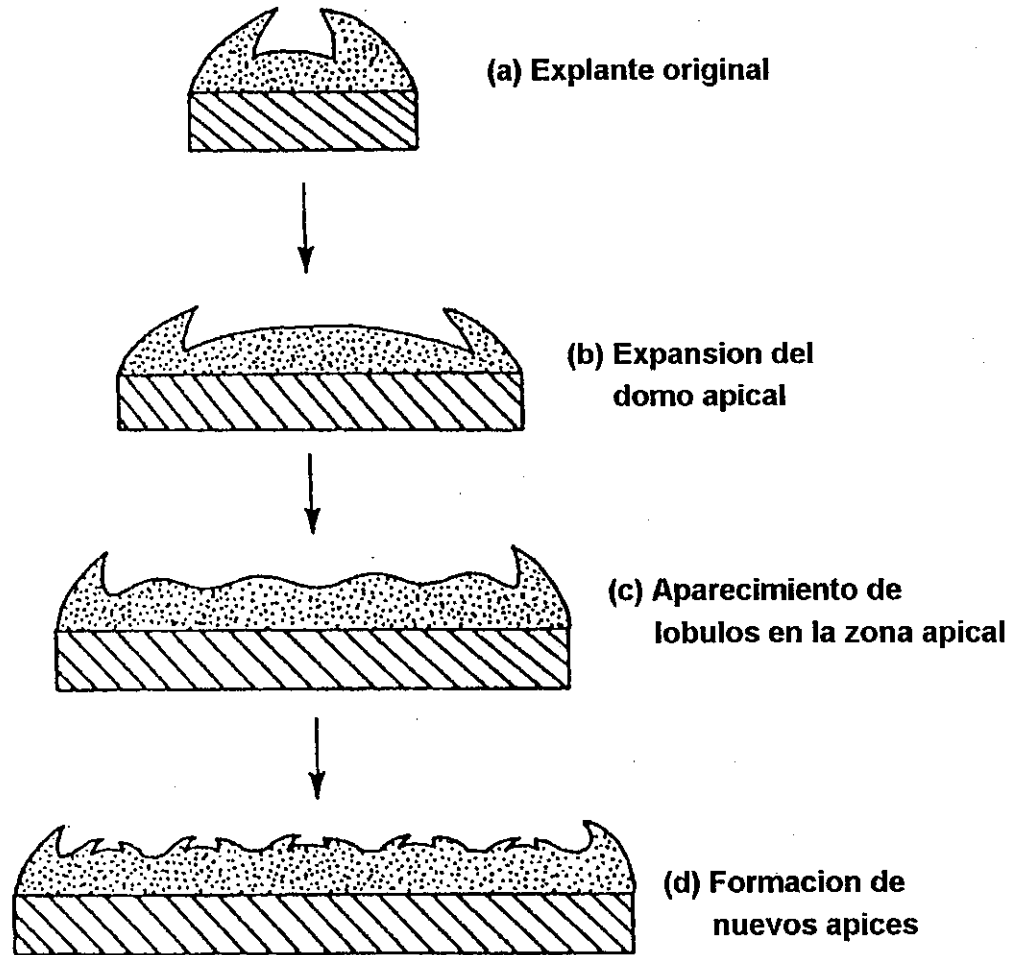


Figura 2 Representación diagramática de la ontogénesis de la formación de nuevos brotes de un meristemo apical.

- cormos de plantas sin fructificar
- material de hijo de espada
- material de hijo de agua
- material de hijos recortados.

El problema que presentan estos materiales de propagación es que pueden diseminar plagas y enfermedades al estar infestado el material inicial o la planta madre. También debilita el anclaje de ésta última, por lo que no es recomendable arrancar más de uno por unidad reproductora.

4.2.2 Micropropagación en Musáceas

Existen varias técnicas de micropropagación que se utilizan en *Musa*: suspensiones celulares, embriogénesis somática, el sistema de inmersión temporal (RITAS), entre otros, y en los que son utilizados explantes provenientes de porciones de hojas, rizomas, de flores masculinas y femeninas inmaduras, embriones inmaduros y ápices meristemáticos.

A continuación se hace referencia a algunos de los muchos estudios realizados en *Musa*, principalmente los relacionados con la propagación utilizando ápices meristemáticos:

- En 1993, Acuña (1) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de CORBANA (Corporación Bananera Nacional) en la Rita de Pococí, Costa Rica, micropropagó banano "Grande Naine", a partir de ápices vegetativos. Para el efecto, seleccionó hijos de 20-40 cm de altura de plantas con buen racimo. Lavó los cormos con agua y jabón, y los redujo a un tamaño de cinco por dos centímetros; ya en el laboratorio fueron sometidos a una serie descendente de soluciones desinfectantes con hipoclorito de calcio al 5.25%. Finalmente el ápice se redujo a un centímetro cúbico (0.5 de corno y 0.5 de vástago) y fueron inoculados en un medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con seis miligramos por litro de BA (Bencilaminopurina), bajo luz fluorescente (10 wats por metro cuadrado) con un fotoperíodo de 16 horas luz y ocho de oscuridad.

- En Costa de Marfil, Africa, Mateille et al (22) realizaron la micropropagación del cultivar de banano "Poyo", utilizando brotes apicales y laterales, los que fueron estimulados por una alta concentración de BA, (siete miligramos por litro), en ausencia de auxinas. Luego estos brotes fueron transferidos a un medio de regeneración. Para la elongación de tallos y enraizamiento se utilizó un medio sin reguladores de crecimiento y 10 g\l de sacarosa. El enraizamiento fue mejor cuando el fondo de los tubos que contenía el medio se mantuvo en oscuridad.

- Aziz (7) trabajando en Malasia, con los cultivares de banano "Mas" y "Berangan" y utilizando ápices meristemáticos, como explantes, procedió a sembrarlos en un medio MS modificado con distintos niveles de BA, que iban desde cero hasta nueve miligramos por litro. El cultivo "Berangan" dio brotes a los 14 días después de haber sido colocado en el medio. Los niveles entre siete y nueve miligramos por litro retardaron el crecimiento por 10 días en el cultivar "Mas". Las dosis óptimas para cada subcultivo están en el rango de tres a siete miligramos por litro de BA. La adición de un miligramo por litro de AIB más 0.025% de carbón activado, causó un buen enraizamiento.

- En Brasil, Alves (3) utilizó explantes de cinco milímetros cúbicos provenientes de yemas laterales de banano "Prata" (AAB) fueron establecidos con 28 días de incubación en un medio MS suplementado con cinco miligramos por litro de BA. Posteriormente fueron trasladados a un nuevo medio de multiplicación con distintos niveles de BA: 2.5, 5.0 y 7.5 mg\l. Fueron obtenidos de dos a cuatro brotes por cada explante utilizando 2.5 mg\l de BA. Los brotes fueron inducidos a enraizamiento con la mitad de la concentración de sales minerales del medio MS, complementado con 0.1, 1.0 y 5.0 mg\l de AIB y 0.25% de carbón activado. Los enraizamientos ocurrieron después de siete días con cinco miligramos por litro de AIB.

- En los laboratorios de Cultivo de Tejidos de CORBANA, en Costa Rica, Acuña et al implementaron un ensayo con el objetivo de determinar el uso de bajas concentraciones de BA en la micropropagación de plátano (Musa balbisiana c.v. Currare). Utilizaron hijos de 30-50 cm de altura. Durante las tres etapas de cultivo in vitro, los explantes fueron incubados a una temperatura de 27-28 grados centígrados con un fotoperíodo de 16 horas luz. En la etapa de iniciación se evaluó la oxidación causada por fenoles y el incremento en peso por miligramo de

tejido sembrado. Cuando los explantes fueron transferidos de la etapa de iniciación a la de multiplicación, estos se colocaron en un medio con el doble de concentración de BA. Los explantes que alcanzaron mayor ganancia fueron los tratados con un miligramo por litro de BA (19.27 mg), en contraste con estos resultados, el peso ganado con el tratamiento cero miligramos por litro de BA fue menor del 50% del peso ganado por los tratamientos con BA (6.11 mg). Estos resultados confirman el papel de las citocininas en la mitosis. (1)

- Lameira et al (16) en Brasil, desarrollaron una investigación para determinar el efecto del tamaño del explante en la micropropagación in vitro de *Musa acuminata* c.v. "Prata" y "Nanicao". Estos experimentos con tamaños de 0.5, 1.0 y 1.5 cm cúbicos fueron cultivados en un medio básico MS, adicionado con cinco miligramos por litro de BA, 25 mg/l de ácido ascórbico y 10% de agua de coco, solidificado con agar al 0.7%. Los explantes de 0.5 cm cúbicos reprodujeron una media de tres brotes que medían un cm de largo, a las siete semanas de incubación.

- Los investigadores del FHIA (Fondo Hondureño de Investigación Agrícola), en San Pedro Sula, Honduras, utilizan ápices meristemáticos en la micropropagación de *Musáceas*, seleccionando hijuelos de 20 a 40 centímetro de altura. Estos fueron reducidos a un tamaño de cinco cm, luego es extraído el ápice con un tamaño de 0.5 cm y sembrado en un medio de iniciación MS, para luego trasladarlo a uno de multiplicación (MS) con tres a cinco miligramos por litro de BA. La tasa de multiplicación en plátano es de dos a cuatro brotes por explante, Posteriormente, cada brote es transferido a un medio MS de enraizamiento con un miligramo por litro de la auxina (AIA). (24)

- En el Instituto Taiwanés de Investigación del Banano (17), en provincia de Ping Tung, en Taiwan, los doctores Sin-Wan Lee y Shin-Chuan Hwang, en 1983, introdujeron la innovación de decapitar el meristema apical, para estimular el crecimiento de un mayor número de brotes. Los nuevos brotes que resultaron del explante fueron decapitados repetidamente para incrementar la cantidad de brotes. El resultado del alargamiento y enraizamiento de los brotes adventicios fueron las plántulas, que después de un período de aclimatación de dos a tres meses en un vivero protegido, fueron suministradas a los productores. Las plantas propagadas in vitro, demostraron una tasa de sobrevivencia más alta, un crecimiento vigoroso y uniforme al compararlas con los retoños. La ocurrencia de plantas anormales fue de dos a 2.5%. Los cultivares propagados fueron el "Pei Chiao" (Giant Cavendish), "Tai

Chiao No.1" (resistente a Fusariosis) y el "Cavendish B.F." (un cultivar semienano). El medio utilizado en la etapa de multiplicación fue un Murashige and Skoog modificado con cinco miligramos por litro de BA, con dos miligramos por litro de AIA, 160 mg\l de sulfato de adenina y 100 mg\l de L-tirosina. Para la etapa de regeneración solamente los reguladores BA e AIA fueron reducidos a la mitad.

- Los investigadores Chen y Lin (35) obtuvieron plantas de banano "Giant Cavendish", originadas de brotes adventicios, utilizando el mismo medio descrito por Lee y Hwang, solo que cambiaron la citocinina, ya que en lugar de BA utilizaron dos miligramos por litro de cinetina. Alrededor de cinco a 10 brotes proliferaron por cada explante, después de seis a ocho semanas de incubación a 25 grados centígrados.
- Ramírez (25) investigadora del ICTA (Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola), en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales en Quetzaltenango, micropropagó ápices meristemáticos de dos cultivares de plátano, el "FHIA-21" y el "Criollo". Para el efecto, utilizó el medio de iniciación MS con un miligramo por litro de BA, mas 600 mg\l de carbón activado. En la etapa de multiplicación aumentó el nivel de BA a cinco miligramos por litro y para el medio de enraizamiento eliminó los reguladores, siempre utilizando medio MS y solamente adicionó 600 mg\l de carbón activado. Los resultados que obtuvo fueron de cinco brotes para el c.v. "FHIA-21" y 4.5 brotes por explante para el "Criollo".

Aguilar y Reyes, estudiaron la posibilidad de propagar banano "Cavendish" (AAA) y "Enano Ecuatorial" (AAA) mediante la técnica de cultivo de tejidos. El establecimiento de los explantes del c.v "Cavendish" fue mejor en la variante de medio de cultivo MS modificado con dos miligramos por litro de BA mas 1.3 mg\l de AIA. El c.v. "Enano Ecuatorial" tuvo la mejor respuesta en las variantes de los medios MS modificado con un miligramo por litro de BA y 1.3 mg\l de AIA, y MS más un miligramo por litro de BA y 2.6 mg\l de AIA. La brotación de yemas del c.v. "Enano Ecuatorial", fue mayor cuando se practicó el corte transversal y longitudinal (con un promedio de seis brotes), que al realizarse solamente el corte transversal (cuatro brotes en promedio), en la variante del medio de cultivo MS mas cinco miligramos por litro de BA. (2)

5. OBJETIVOS

GENERAL:

Encontrar una metodología de micropropagación que permita incrementar la tasa de multiplicación de dos cultivares de plátano (*Musa balbisiana* Colla).

ESPECIFICOS:

1. Evaluar la respuesta de dos cultivares de plátano (*Musa balbisiana* Colla), a dos diferentes metodologías de micropropagación.
2. Determinar el nivel de Bencilaminopurina (BA) más adecuado para cada metodología y cada cultivar.

6. HIPOTESIS

1. Los dos cultivares de plátano (*Musa balbisiana* Colla) responden igual a las dos metodologías.
2. Los dos cultivares de plátano (*Musa balbisiana* Colla) responden en igual forma a todos los niveles de Bencilaminopurina en las dos metodologías.

7. METODOLOGIA

7.1 Area experimental

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) ubicado en Bárcenas, Villa Nueva, departamento de Guatemala.

7.2 Material experimental

La investigación se realizó utilizando los siguientes cultivares de plátano:

7.2.1 *Musa balbisiana* c.v. "Hembra" (AAB)

Las plantas son vigorosas, con pseudotallo de forma cónica y de cuatro metros de altura; de alto rendimiento, con un promedio de ocho manos poco separadas y distribuidas homogéneamente las cuales tiene 13 dedos, el número total de dedos por racimo es de 111 aproximadamente, son plantas tolerantes a condiciones subóptimas de cultivo. El mesocarpio es rosado, de textura almidonosa y sabor dulce. (11)

Este material es procedente de la Estación Experimental "Cuyuta" del ICTA, en el departamento de Escuintla.

7.2.2 *Musa balbisiana* c.v. "Cuernos" (AAB)

Este plátano es de porte regularmente vigoroso, con pseudotallo que varía desde 3.90 a 4.50 m de altura, de forma cónica de 0.45 m de circunferencia y verde pálido, tendiendo a ser rosado con escasas manchas negras. Completa su ciclo en 352 días aproximadamente, 237 corresponden al período desde la emergencia a la floración y 114 de este último estadio hasta la madurez fisiológica. (11)

El racimo producido es de 0.78 m de largo y pesa 15 kg en promedio, el racimo presenta entre 40-45 dedos o frutos comerciales por mano. Es altamente susceptible al picudo del banano o gorgojo negro (Cosmopolites sordidus Germ.). Se caracteriza por el color amarillo claro de la pulpa, su textura suave y sabor dulce. Es utilizado como sombra temporal de café (Coffea arabica L.). (11)

Este material es procedente del Parcelamiento La Blanca Ocos, en el departamento de San Marcos.

7.2.3 Bencilaminopurina

La 6-bencilaminopurina es una aminopurina, derivada de la adenina. El nombre comercial es BA. Su peso molecular es de 225.26 y su fórmula química es $C_{12}H_{11}N_5$. Pertenece al grupo de las citocininas, y es muy utilizada en cultivo de tejidos. (30)

Se utilizó en el experimento en dosis de dos, tres, cuatro y cinco miligramos por litro.

7.3 Manejo del experimento

En esta investigación se evaluaron dos metodologías diferentes de micropropagación, que utilizaron distintos tipos de explante y medios. Sin embargo, hay pasos que fueron comunes para ambas, por lo que a continuación se describen éstos:

7.3.1 Selección de la planta madre

Sandoval (29), recomienda que la planta madre esté fructificando para tener la seguridad de que pertenece al cultivar deseado. La planta debe ser vigorosa, sin variación fenotípica y estar completamente sana, libre de plagas y enfermedades.

7.3.2 Selección del hijuelo

Los hijuelos que donaron el explante, tenían una altura de 50-80 cm. Se tuvo mucho cuidado al momento de separarlo de la planta madre, ya que se puede debilitar su anclaje y ocasionarle heridas donde puedan penetrar microorganismos patógenos. Cuando estuvo separado, se eliminó parte del pseudotallo y se traslado al laboratorio. Por lo general se utilizaron hijos de espada.

7.3.3 Desinfección del material experimental

Al material experimental se le quitó el exceso de tierra con un cepillo de cerdas finas, luego las partes externas y las raíces se cortaron con tijera. Luego se hizo una limpieza superficial con algodones empapados con alcohol al 70%.

Posteriormente el material fue reducido hasta obtener secciones de 10 cm de largo y cuatro centímetros de diámetro.

Este material fue sometido a la siguiente desinfección:

- Inmersión en alcohol al 70% por cinco minutos.
- Lavado tres veces con agua estéril.
- Primera inmersión en hipoclorito de sodio (5.25%) sin diluir más tres gotas de Tween 20, por 20 minutos.
- Cinco lavadas con agua estéril o hasta eliminar los residuos de cloro.

Luego bajo condiciones asépticas (dentro de la cámara de flujo laminar) se redujo el tamaño del material a cinco centímetros cúbicos. Este explante consistió en una parte del cormo y varias vainas foliares envolventes del meristema. Seguidamente se realizó la última desinfección:

- Inmersión en hipoclorito de sodio al 2.5% por 10 minutos.
- Tres lavadas con agua estéril.

Ya con el material desinfectado, se procedió a reducir el tamaño del explante para su siembra. Los tamaños definitivos que se utilizaron fueron los siguientes:

- metodología tradicional: ápices meristemáticos de un centímetro cúbico
- metodología taiwanesa: ápices meristemáticos de dos centímetro cúbicos.

Posteriormente se sembraron en un medio de iniciación. A continuación se detalla cada metodología por separado.

7.3.4. Metodología tradicional

Se utilizó como metodología tradicional la descrita por el Fondo Hondureño de Investigación Agrícola (FHIA), localizado en San Pedro Sula, Honduras (24). El proceso se puede dividir en las siguientes etapas:

7.3.4.1 Fase de iniciación

Los ápices meristemáticos desinfectados fueron sembrados en un medio de cultivo Murashige y Skoog (1962), suplementado con un miligramo por litro de BA (Bencilaminopurina), 2.5 g/l de agar y 600 mg/l de carbón activado.

Las condiciones bajo las cuales estuvieron los explantes fueron las siguientes:

- Intensidad lumínica de 1000 Lux
- Fotoperíodo de 16 horas de luz y ocho de oscuridad
- Temperatura de 28 grados centígrados.

7.3.4.2 Fase de multiplicación

Después de cuatro a seis semanas, los ápices meristemáticos alcanzaron un tamaño apropiado para cortarse longitudinalmente en dos. El corte se hizo exactamente al centro del ápice para que ambas partes tuvieran tejido

meristemático. La parte del ápice donde se realizó el corte quedó en contacto directo con el medio de cultivo, esto para evitar la deshidratación del mismo.

Cada mitad, formó un nuevo explante que se sembró en un medio del cultivo Murashige y Skoog (1962) que contenía diferentes niveles de Bencilaminopurina (BA), los cuales fueron dos, tres, cuatro y cinco miligramos por litro, también se adicionó al medio 2.5 g/l de Phytigel como solidificador .

Los explantes se colocaron bajo las siguientes condiciones ambientales:

- Intensidad lumínica de 3,000 Lux
- Temperatura de 25 ± 2 grados centígrados
- Fotoperíodo de 16 horas luz y ocho de oscuridad.

Posteriormente cada explante se dividió en secciones (de acuerdo al número de brotes que formaron) y éstas se colocaron en un medio fresco de Murashige y Skoog (1962) con igual concentración de BA (Bencilaminopurina) al que tenían en el medio anterior.

7.3.5 Metodología taiwanesa

Esta metodología se estableció en Taiwan en 1983 (por lo que en el presente trabajo se le designa como metodología taiwanesa). Fue desarrollada en el Instituto Taiwanés de Investigación del Banano; basándose en el principio fisiológico de que al decapitar el meristema apical hay proliferación de brotes. El procedimiento se dividió en las siguientes etapas:

7.3.5.1 Fase de iniciación

Esta etapa no se cita en la literatura relacionada con esta metodología, sin embargo, en esta evaluación se considero oportuno efectuarla.

Los explantes sin decapitar fueron colocados en un medio MS suplementado con un miligramo por litro de BA, 600 mg/l de carbón activado y 2.5 g/l de Phytigel. Las condiciones ambientales fueron las mismas que en la metodología tradicional:

- Intensidad lumínica de 1000 Lux
- Temperatura de 25 ± 2 grados centígrados
- Fotoperíodo de 16 horas luz y ocho de oscuridad.

La duración de esta etapa fue de cuatro semanas.

7.3.5.2 Fase de multiplicación

Al explante se le procedió a cortar el meristema apical, y se colocó en un nuevo medio MS, suplementado con:

- Tiamina HCl : 0.4 mg/l
- L-tirosina:100 mg/l
- Acido indolacético (AIA) : dos miligramos por litro
- Sulfato de adenina: 160 mg/l
- Bencilaminopurina (BA): dos, tres, cuatro y cinco miligramos por litro
- Phytigel: 2.5 g/l

Las condiciones ambientales fueron de 3,000 Lux de intensidad lumínica; 25 ± 2 grados centígrados de temperatura y 16 horas luz de fotoperíodo.

Luego de cuatro a nueve semanas cuando hubo proliferación de brotes, estos fueron divididos en grupos de dos o tres e inoculados por otras cuatro semanas en un medio igual a del que procedían.

7.4 Diseño experimental

El ensayo se dispuso en un diseño estadístico de bloques al azar, donde cada bloque fue un día de trabajo equivalente a 16 tratamientos por día, durante 10 días. Los tratamientos tuvieron un arreglo trifactorial.

7.5 Modelo estadístico

El modelo estadístico utilizado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = U + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + R_1 + E_{ijkl}$$

U = efecto de la media general

A_i = efecto de la i -ésima metodología

B_j = efecto del j -ésimo nivel de BA

C_k = efecto del k -ésimo cultivar

AB_{ij} = efecto de la interacción entre la i -ésima metodología y el j -ésimo nivel de BA

AC_{ik} = efecto de la interacción entre la i -ésima metodología y del k -ésimo cultivar

BC_{jk} = efecto de la interacción del j -ésimo nivel de BA y el K -ésimo cultivar

ABC_{ijk} = efecto de la triple interacción entre la i -ésima metodología, el j -ésimo nivel de BA y el k -ésimo cultivar.

R_1 = efecto de i -ésimo bloque

E_{ijkl} = error experimental asociado a la $ijkl$ -ésima unidad experimental.

7.6 Análisis estadístico

Se realizó un Análisis de Varianza correspondiente a un diseño de bloques al azar para las siguientes variables: número de brotes y longitud de los mismos. Se hizo un análisis gráfico de los promedios de número de brotes y longitud de éstos.

La prueba de medias que se utilizó para determinar los mejores tratamientos fue la de Duncan.

7.7 Variables respuesta

En cada unidad experimental se evaluaron las siguientes variables:

7.7.1 Número de brotes

Se contó el número de brotes, para determinar que nivel de Bencilaminopurina es el óptimo, que metodología es la más eficiente y que cultivar responde mejor.

7.7.2 Altura de brotes

Se analizó la altura de los brotes, para determinar la relación entre número de brotes y longitud de éstos.

7.8 Unidad experimental

La unidad experimental utilizada fue un frasco alto, con 50 ml de medio. Hubo un total de 160 unidades experimentales.

7.9 Tratamientos

Se evaluaron 16 tratamientos con diez repeticiones, que correspondieron a las combinaciones surgidas entre las dos metodologías (tradicional y taiwanesa), los dos cultivares de plátano ("Hembra" y "Cuernos") y los cuatro niveles de Bencilaminopurina (dos, tres, cuatro y cinco miligramos por litro), por lo tanto, los tratamientos se ordenaron así:

Cuadro 1. Tratamientos considerados en la micropropagación de plátano.

Tratamiento	Metodología	Cultivar	Nivel de BA (mg/l)
1	taiwanesa	"Hembra "	2
2	taiwanesa	"Cuernos"	2
3	taiwanesa	"Hembra "	3
4	taiwanesa	"Cuernos"	3
5	taiwanesa	"Hembra "	4
6	taiwanesa	"Cuernos"	4
7	taiwanesa	"Hembra "	5
8	taiwanesa	"Cuernos"	5
9	tradicional	"Hembra "	2
10	tradicional	"Cuernos"	2
11	tradicional	"Hembra "	3
12	tradicional	"Cuernos"	3
13	tradicional	"Hembra "	4
14	tradicional	"Cuernos"	4
15	tradicional	"Hembra "	5
16	tradicional	"Cuernos"	5

8. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en el ensayo son presentados y discutidos de acuerdo a cada fase de experimentación llevada a cabo.

8.1 Desinfección del material inicial

En la fase de establecimiento la contaminación fue el principal problema que se presentó debido a la presencia de bacterias endógenas. Este tipo de contaminación se caracterizó porque en la base de los explantes se observó un halo blanco o exudados amarillentos, que provocaron la posterior necrosis del explante.

El cultivar "Hembra", procedente de Cuyuta, fue más susceptible a contaminarse, debido a que el material provenía de áreas que presentaban mal drenaje, característica, que según el Protocolo de Cultivo del Tejidos Vegetales del CATIE, citado por Sandoval (29), es causa de contaminación.

El método más efectivo que se encontró para reducir la contaminación, fue el de eliminar el exceso de tierra con un cepillo de cerdas finas y hacer una limpieza superficial con algodones empapados con alcohol al 70%. Se evitó el uso de agua corriente, ya que esta favorecía el desplazamiento de microorganismos al interior de los tejidos.

Posteriormente, se procedió a reducir el corno y a utilizar una serie descendente de desinfecciones con alcohol e hipoclorito de sodio.

8.2 Fase de iniciación

Esta fase fue el período previo a la formación de brotes. Fue importante su establecimiento por dos razones:

Para una mejor adaptación fisiológica de los explantes estériles a las nuevas condiciones de crecimiento in vitro; lograr que sobrevivieran y provocaran la respuesta esperada.

Y para evitar que los fenoles exudados por las heridas del corte, causaran la oxidación de los explantes y su posterior necrosis. Por ello fue importante, la adición al medio de 600 mg/l de carbón activado como antioxidante.

Se agregó un miligramo por litro de BA al medio MS, para que estimulara la división celular, e indujera al crecimiento en longitud y diámetro del explante. Se observó una coloración verde oscuro de los explantes y una fuerte dominancia apical.

Según Sandoval (29), los ápices se cultivan en el medio de iniciación durante 30 días, pero en este caso el c.v. "Cuernos" respondió a las tres semanas y el "Hembra" a las cuatro semanas, demostrando el primero mayor precocidad en el tiempo de respuesta.

Esta fase no está establecida en el protocolo de la metodología Taiwanesa, pero se consideró necesario implementarla en la presente investigación, por las razones arriba expuestas. Al momento de trasladar el explante al medio de multiplicación, le fue cortado el meristemo apical.

8.3 Fase de multiplicación

Aunque las etapas anteriores fueron importantes, la fase de multiplicación fue la parte medular de la presente investigación; ya que, de acuerdo con el objetivo general, la finalidad era aumentar la tasa de brotación.

El Análisis de Varianza practicado a la variable número de brotes (cuadro 2) mostró diferencias significativas entre las distintas fuentes de variación, (a excepción de bloques y cultivar * BA). Se determinó que hubo una interacción entre la metodología, el cultivar y el nivel de BA, ya que el nivel de significancia es de 1.35%, inferior al nivel establecido de 5%, lo que indicó que el número de brotes depende tanto del cultivar, como de la metodología y del nivel de Bencilaminopurina.

Cuadro 2. Análisis de Varianza para la variable número de brotes en micropropagación en plátano.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Valor de F	Pr>F
Modelo	24	1874.5143	122.77	0.0001**
Bloques	9	3.8101	0.66	0.7401NS
Método	1	378.4890	593.65	0.0001 **
Cultivar	1	28.4223	44.58	0.0001 **
MétodoxCultivar	1	48.4150	75.94	0.0001 **
BA	3	1151.9138	602.25	0.0001 **
MétodoxBA	3	221.0516	115.55	0.0001 **
CultivarxBA	3	2.4753	1.29	0.2793 NS
MétodoxCultivarxBA	3	7.0814	3.70	0.0135 *
Error Experimental	129	82.2454		
Total Corregido	153	1960.7597		

Según la prueba de Duncan al 10%, aplicada a las medias de número de brotes (cuadro 3), las modalidades metodología taiwanesa, cultivar "Cuernos", y los niveles de cuatro y cinco miligramos por litro de BA, resultaron ser las más eficientes, en la proliferación de brotes, con un promedio de 11.45 brotes por explante.

La misma prueba permitió ver que la alternativa metodología tradicional, cultivar "Cuernos" o cultivar "Hembra" y dos miligramos por litros de BA, es la que presenta menor eficiencia, al obtenerse solamente un brote.

Cuadro 3. Prueba de Duncan para la variable número de brotes.

Tratamiento	Número de brotes	Grupo Duncan
taiwanesa x "Cuernos" x 5 mg/l BA	11.5	a
taiwanesa x "Cuernos" x 4 mg/l BA	11.4	a
taiwanesa x "Hembra " x 4 mg/l BA	9.0	b
taiwanesa x "Hembra " x 5 mg/l BA	8.7	b
tradicional x "Hembra " x 5 mg/l BA	5.2	c
tradicional x "Cuernos" x 5 mg/l BA	4.8	c
tradicional x "Hembra " x 4 mg/l BA	4.5	d
taiwanesa x "Cuernos" x 3 mg/l BA	4.1	d
tradicional x "Cuernos" x 4 mg/l BA	4.0	d
taiwanesa x "Hembra " x 3 mg/l BA	2.3	e
tradicional x "Hembra " x 3 mg/l BA	2.2	e
tradicional x "Cuernos" x 3 mg/l BA	2.2	e
taiwanesa x "Cuernos" x 2 mg/l BA	2.0	e
taiwanesa x "Hembra " x 2 mg/l BA	1.0	f
tradicional x "Hembra " x 2 mg/l BA	1.0	f
tradicional x "Cuernos" x 2 mg/l BA	1.0	f

En la figura 3, es posible observar gráficamente el comportamiento de los cultivares evaluados, según la metodología y el nivel de Bencilaminopurina utilizados. Tanto para la metodología tradicional, como para la taiwanesa, hay un cambio en la pendiente a partir de tres miligramos por litro de Bencilaminopurina, lo que indica que en los niveles inmediatos superiores es donde hay mayor proliferación de brotes, luego la línea se mantiene constante entre cuatro y cinco miligramos por litro por lo que no se observa mayor diferencia de respuesta, lo que es válido para todas las metodologías y cultivares.

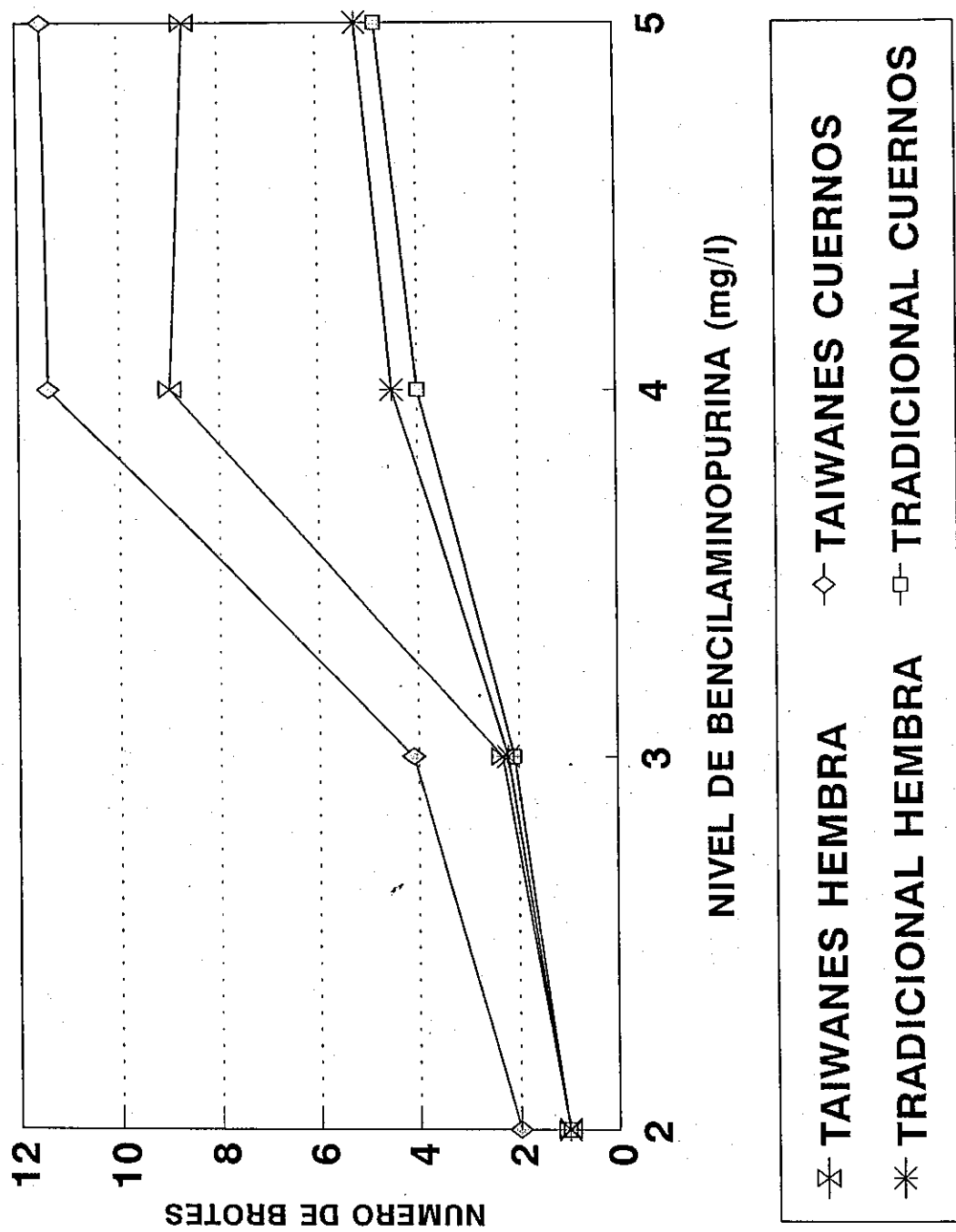


Figura 3. Número de brotes por nivel de Bencilaminopurina según métodos de propagación y cultivares.

El incremento de la pendiente es más pronunciado en las líneas que corresponden a la metodología taiwanesa en ambos cultivares, observándose en ésta última una mayor proliferación de brotes.

Se desconoce el punto o nivel de BA en el que empieza la declinación de la pendiente, y por ende, la disminución en la tasa de brotación, ya que únicamente se evaluó hasta cinco miligramos por litro de BA.

Los datos estadísticos obtenidos se presenta en el cuadro 3, donde se puede inferir que para la metodología tradicional, la mayor proliferación de brotes se logró con cinco miligramos por litro de BA, con un promedio de 5.2 y 4.8 brotes para el cultivar "Hembra" y "Cuernos" respectivamente. El número de brotes que regularmente se obtiene para materiales triploides es de 4.5, tal es el caso de los resultados que obtuvo Ramírez (25) en su ensayo utilizando un material criollo (AAB).

La metodología taiwanesa, mostró una alta tasa de proliferación de brotes, en comparación con la metodología tradicional, con 11.45 brotes por explante para el cultivar "Cuernos" con niveles de cuatro y cinco miligramos por litro de BA y, 9 y 8.7 brotes para el cultivar "Hembra" en los mismo niveles de Bencilaminopurina (cuadro 3). Si se compara este resultado con los que reportan en el Instituto Taiwanés de Investigación del Banano, de 15 a 25 brotes, los obtenidos en la presente investigación son un poco bajos, pero hay que considerar que los datos que presentan en Taiwan son para cultivares de banano, especialmente para el "Pei Chao", aparte de que, los explantes provenían de plantas micropropagadas, por lo que existió residualidad de Bencilaminopurina. Tampoco hay informes referentes a cultivares de plátano. (17)

La diferencia de respuesta en la tasa de brotación entre cultivares, que es de un promedio de tres brotes, se debe a que ésta varía según el cultivar y el genotipo del material utilizado.

Al comparar ambas metodologías, es obvio, que la taiwanesa produjo mayor número de brotes, esto se relaciona con el hecho de haber cortado el meristema apical a los explantes utilizados en dicha metodología, lo que rompió la dominancia apical e indujo a la formación de más brotes laterales. También coadyuvó, la adición al medio de otros suplementos como el sulfato de adenina, L-tirosina y ácido indolacético.

Como ambos cultivares respondieron de manera similar con cuatro y cinco miligramos por litros de BA; es importante señalar, que es más conveniente utilizar el nivel mas bajo de BA que da la máxima proliferación, en éste caso es el nivel de cuatro miligramos por litros de BA; ya que a mayor concentración de BA, mayor será la cantidad de mutaciones que puedan presentarse; aparte, de que hay un ahorro en costos, que se hace significativo, cuando se producen plántulas a nivel comercial.

Los tiempos de respuesta de los cultivares evaluados, también se enmarcaron dentro de los reportados en otros estudios, Sandoval (29) estima un promedio de seis semanas para el plátano en general, Ramírez (25) señala que para el c.v "FHI-21" el tiempo fue de ocho semanas, en la presente investigación el c.v "Cuernos" respondió a las seis semanas y el c.v. "Hembra" a las nueve semanas.

La menor tasa de multiplicación se encuentra en el nivel de dos miligramos por litros de BA, para ambos cultivares, con un brote por explante; con tres miligramos por litro hay un promedio de 2.4 brotes (cuadro 3), coincidiendo con los resultados obtenidos por Ovalle (22) que con el mismo nivel de BA, y trabajando con un plátano criollo (ABB) logró 2.6 brotes.

En general, los brotes presentaron buen aspecto, vigorosos, con una altura promedio de 1.9 cm. Cada brote presentó una media de dos hojas, que al principio presentaron un verde claro, similar al del tallo, pero conforme fueron creciendo se tornaron a un verde oscuro. Ninguno de los brotes presentó síntomas de enfermedades o deshidratación.

De acuerdo con la figura 4, donde se presenta gráficamente el comportamiento de la altura en función de la dosis de Bencilaminopurina utilizada, se puede inferir que a mayor número de brotes menor altura de éstos, y que cuando la altura alcanza su punto máximo, la tasa de multiplicación es mínima.

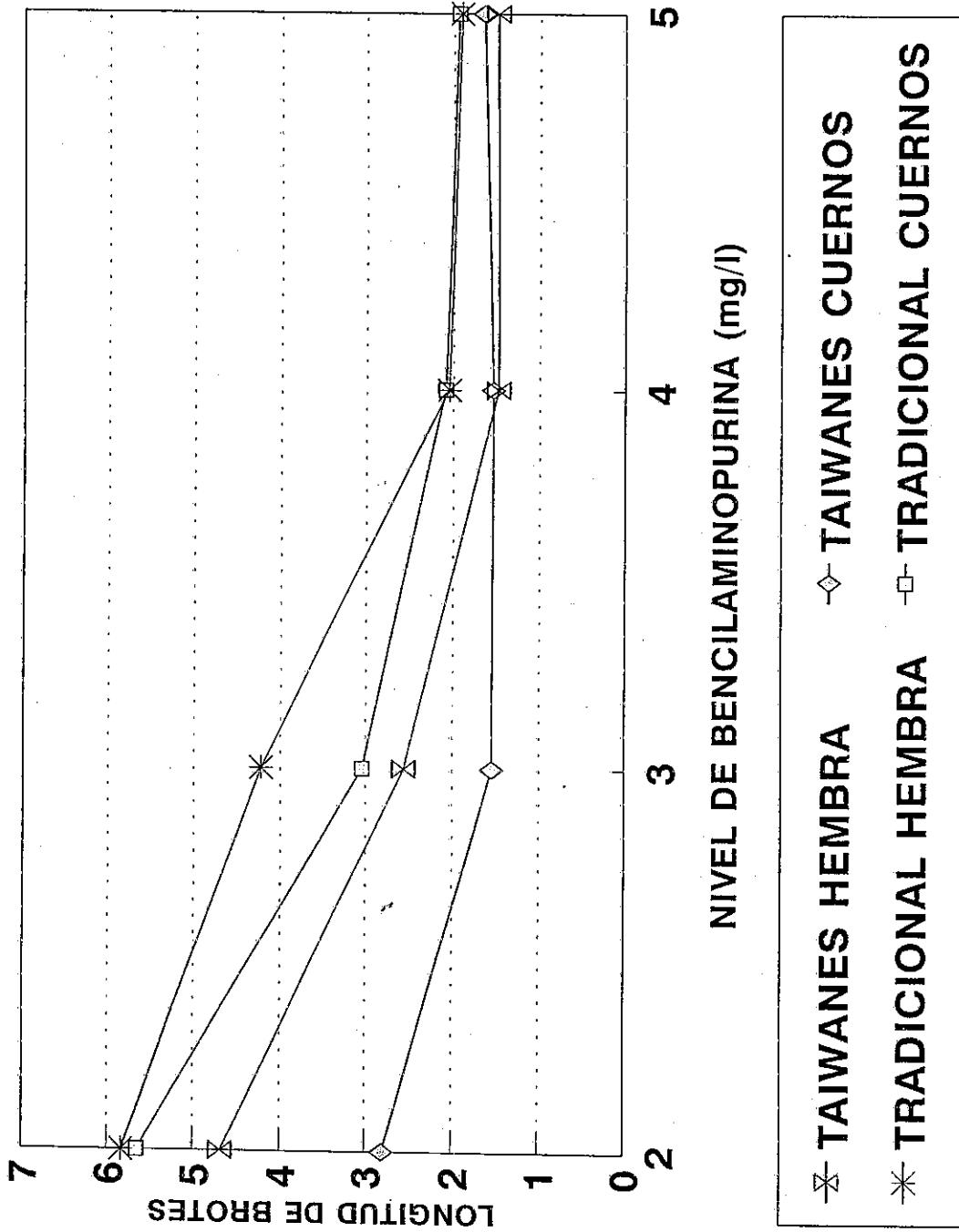


Figura 4. Longitud de brotes (cm) por nivel de Bencilaminopurina según métodos de propagación y cultivares.

Al realizar el Análisis de Varianza para la variable longitud de los brotes, es posible determinar que hubo interacción entre la metodología, el cultivar y el nivel de Bencilaminopurina (cuadro 4), ya que el nivel de significancia de 0.03% es inferior al establecido de 5%, por lo que se realizó una Prueba de Medias de Duncan (Cuadro 5) donde se determinó que la altura máxima se obtiene con el cultivar "Hembra", la metodología tradicional y dos miligramos por litro de Bencilaminopurina.

Cuadro 4. Análisis de Varianza para la variable longitud de brotes.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Valor de F	Pr>F
Modelo	24	296.1307	34.21	0.0001**
Bloques	9	0.7542	0.23	0.9892NS
Método	1	30.5434	84.69	0.0001**
Cultivar	1	2.8625	7.94	0.0056**
MetodoxCultivar	1	6.0945	16.90	0.0001**
BA	3	220.6841	203.96	0.0001**
MetodoxBA	3	15.0636	13.92	0.0001**
CultivarxBA	3	7.6525	7.07	0.0002**
MetodoxCultivarxBA	3	7.3099	6.76	0.0003**
Error	9	46.5251		
Total Corregido	153	342.6558		

Lo que más interesaba en este estudio era aumentar la tasa de proliferación de brotes, por lo que la longitud, aunque fue un parámetro importante para determinar si las plantas estaban aptas para su paso a la siguiente fase de enraizamiento, no fue determinante en los resultados, ya que, ésta y el diámetro, es posible incrementarlos, al trasladar los brotes en pequeños grupos de dos o tres, a otro medio, igual al del que procedían, donde pueden continuar su crecimiento.

CUADRO 5. Prueba de Medias de Duncan para 16 tratamientos para la variable longitud (cm) de brotes.

Tratamiento	Altura en centímetros	Grupo Duncan
Tradicional - Hembra - 2 mg/l de BA	5.8	a
Tradicional - Cuernos- 2 mg/l de BA	5.6	a
Taiwanesa - Hembra - 2 mg/l de BA	3	b
Tradicional - Cuernos- 3 mg/l de BA	2.8	b
Taiwanesa - Cuernos- 2 mg/l de BA	2.5	c
Taiwanesa - Hembra - 3 mg/l de BA	2.4	c
Tradicional - Hembra - 3 mg/l de BA	2	c
Tradicional - Cuernos- 4 mg/l de BA	2	c
Tradicional - Hembra - 4 mg/l de BA	1.9	c
Tradicional - Cuernos- 5 mg/l de BA	1.9	d
Tradicional - Hembra - 5 mg/l de BA	1.9	d
Taiwanesa - Cuernos- 5 mg/l de BA	1.9	d
Taiwanesa - Cuernos- 3 mg/l de BA	1.5	d
Taiwanesa - Cuernos- 4 mg/l de BA	1.5	d
Taiwanesa - Hembra - 5 mg/l de BA	1.5	d
Taiwanesa - Hembra - 4 mg/l de BA	1.5	d

Según Sandoval (29) y Pocasangre (24), los brotes se consideran aptos para su traslado a un medio de enraizamiento, si tienen una altura de dos a cuatro centímetros, y dos o tres hojas formadas, condiciones que cumplen los brotes obtenidos en ambas metodologías.

9. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento se puede concluir lo siguiente.

1. La metodología taiwanesa, fue la que produjo mayor tasa de proliferación de brotes, con un promedio de 11.5 brotes para el c.v. "Cuernos", y nueve brotes para el c.v. "Hembra". Con la metodología tradicional se obtuvo una media de cuatro brotes para el cultivar "Hembra" y 4.5 para el "Cuernos".
2. Los niveles cuatro y cinco miligramos por litro de Bencilaminopurina son los que respondieron mejor, en las dos metodologías y en los dos cultivares.

10. RECOMENDACIONES

Basados en la experiencia y los resultados obtenidos, se puede hacer las recomendaciones siguientes.

1. Continuar la investigación en las fases de enraizamiento y aclimatación en invernadero, para determinar el porcentaje de sobrevivencia de los brotes originales por cada una de las metodologías.
2. Trabajar con cuatro miligramos por de Bencilaminopurina, ya que es el nivel más bajo donde se obtiene la mayor proliferación de brotes, y evitar, el uso de mayores concentraciones que puedan aumentar la cantidad de mutaciones. También puede significar un ahorro en costos, cuando se trabaja a gran escala, pero para determinar esto, se debe hacer un análisis económico.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1- ACUÑA, P. 1993. Micropropagación de banano (Musa acuminata) a partir de ápices vegetativos. CORBANA (C. R.) 17(39):9-12.
- 2- AGUILAR, M.; REYES, C. 1992. Estudio preliminar de la micropropagación de clones de banano (Musa sp.) "Cavendish" (AAA) y "Enano Ecuatorial" (AAA). Germoplasma (Nic.) no. 1:64-73.
- 3- ALVES, O. 1990. Propagación *in vitro* de banano "Prata" por medio de cultivo vegetales. Pesquisa Agropecuaria Brasileira (Bra.) 25(11):1613-1617.
- 4- ANGARITA, A.; PEREA, M. 1991. Micropropagación de plátanos y bananos. *In* Cultivo de Tejidos en Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. p. 496-511
- 5- ARIAS, O. 1986. Producción y variación somaclonal de plantas de banano c.v. "Gran Enano" producidas por medio de cultivo de tejidos. ASBANA (C.R.) no. 28:6-11.
- 6- ----- . 1992. Commercial micropropagation of banana. *In* Biotechnology Applications for Banana and Plantain Improvement. France, INIBAP. P. 139-143 p.
- 7- AZIZ, M.A. 1992. Micropropagation of Musa c.v. "Mas" and "Bengaran". Musarama (Fran.) 7(3):8-9.
- 8- BIDWELL, R. 1979. Fisiología vegetal. Trad. por Manuel Rojas. México, AGT. 794 p.
- 9- CARDEÑOSA, R. 1955. El género Musa en Colombia. Calí, Colombia, Pacífico. 368 p
- 10- CHAMPION, J. 1978. El plátano. Trad. por Fermín Palomeque. Barcelona, España, Blume. 247 p.
- 11- CONTRERAS, M. 1991. Identificación y caracterización de 16 clones de plátano Tabasco. Chapingo, México, Colegio de Postgraduados. 74 p.
- 12- CRONQUIST, A. 1986. Botánica básica. Trad. por Antonio Ambrosio. México, CECSA. 655 p.
- 13- DEVLIN, R. 1980. Fisiología vegetal. 2 ed. Barcelona, España, Omega. 517 p.
- 14- GUATEMALA. BANCO DE GUATEMALA. 1998. Estadísticas de productos agrícolas. Guatemala. 23 p.
- 15- HARTMAN, H.; KESTER, D. 1987. Propagación de plantas. Trad. por Antonio Ambrosio. México, CECSA. 170 p.
- 16- LAMERIA, O.A. 1988. Determinación de la tasa de multiplicación del banano "Prata" y "Manicao". Pesquisa Agropecuaria Brasileira (Bra.) 12 (2):207-211.
- 17- LEE, W. 1984. Banana micropropagation system in Taiwan. Taiwan, Banana Institute. 15 p.
- 18- ----- . 1991. Micropropagation. Holanda, Kluwer Academic Publishers. 23 p.
- 19- LEON, J. 1987. Botánica de cultivos tropicales. San José, Costa Rica, IICA. 45 p.
- 20- MATEILLE, I. 1988. Micropropagation of Musa AAA c.v. "Poyo" in the Ivory Coast. Musarama (Fran.) (3):9-10.
- 21- OROZCO, C. 1996. Cultivo de tejidos y su aplicación en agricultura. *In* Simposio Nacional sobre Cultivo de Tejidos Vegetales (1., 1996, Guatemala). Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. p. 1-10

- 22- OVALLE, C. 1996. Evaluación de cuatro dosis de Bencilaminopurina para la propagación *in vitro* de la vr. de plátano criollo amarillo (*Musa AAB*) en Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ciencias Agrícolas. 47 p.
- 23- PEREZ, L. 1993. Desempeño en el campo de plantas de banano "Grande Naine" provenientes de cultivo de tejidos y retoños. CORBANA (C. R.) 16(38):28-33.
- 24- POCASANGRE, L. 1993. Manual de micropropagación de plátano y banano. San Pedro Sula, Honduras, Fondo Hondureño de Investigación Agrícola. 53 p.
- 25- RAMIREZ, E. 1996. Micropropagación de plátano (*Musa AAAB*) y (*Musa AAB*). In: Simposio Nacional Sobre Cultivo de Tejidos Vegetales. (1., 1996, Guatemala). Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. p. 41-47.
- 26- REUNION LATINOAMERICANA DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL (3., 1998, La Habana). Resumen. La Habana, Cuba, Red de Biotecnología Vegetal. 597 p.
- 27- ROCA, W.; MROGINSKI, L. 1991. Cultivo de tejidos vegetales en agricultura; fundamentos y aplicaciones. Colombia, Centro Internacional de Agricultura Tropical. 969 p.
- 28- RUIZ, D. 1996. Forma de preparación de medios de cultivo Murashige and Skoog. San Pedro Sula, Honduras, Fondo Hondureño de Investigación Agrícola. 25 p.
- 29- SANDOVAL, J. 1987. Micropropagación de plátano y banano (*Musa AAB, AAA*) en el CATIE. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 24 p.
- 30- SIGMA. 1997. Catalogue plant culture. USA. 131 p.
- 31- STANFIELD, W. 1984. Genética. Trad. por Esteban Fraga. 2 ed. México, McGraw-Hill. 404 p.
- 32- STEVENSON, F. 1980. Anatomía vegetal. México, Limusa. 209 p.
- 33- STOVER, R.; BUDDNHAGEN, W. 1986. Fitomejoramiento del banano: plóidia, resistencia a enfermedades y productividad. In Mejoramiento Genético de Banano y Plátano en Brasil y Honduras. Panamá, Unión de Países Exportadores de Banano. p. 25-31.
- 34- TAIWAN. TAIWAN BANANAN RESEARCH INSTITUTE. 1981. Procedure and application of banana micropropagation technique in Taiwan. Taiwan. 10 p.
- 35- VUYLSTEKE, D. 1989. Histomorphological studies of shoot bud proliferation. Tropical Agricultura (Tri.) no. 62:323-328.
- 36- WEAVER, R. 1989. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. México, Trillas. 622 p.



Bo. Rolando Barrios.

ANEXO



ANEXO 1. Lista de abreviaturas utilizadas

AIA	Acido 3-indol-acetico
BA	Bencilaminopurina
ELISA	Enzyme-linked-immunisorbent assay
BBTV	Banana Bunchy Top Virus
CMV	Virus del Mosaico de Cocombro.
ADN	Acido desoxiborribonucleico
ARN	Acido Ribonucleico.
MS	Medio Murashige y Skoog (1962)
mg/l	Miligramos por litro
g/l	Gramos por litro
cm	Centímetros
mm	Milímetros
m	Metros
mM	Milimoles

CUADRO 6A: Datos originales generados en el estudio de micropropagación de plátano.

TRATAMIENTO	METODOLOGIA	CULTIVAR	NIVEL DE BENCILAMINOPURINA	BLOQUES	NUMERO DE BROTES	LONGITUD BROTES
1	taiwanesa	hembra	2	1	1	4
2	taiwanesa	hembra	3	1	3	1.8
3	taiwanesa	hembra	4	1	8	1.3
4	taiwanesa	hembra	5	1	10	1.7
5	taiwanesa	cuernos	2	1	2	3
6	taiwanesa	cuernos	3	1	5	1.5
7	taiwanesa	cuernos	4	1	11	1.2
8	taiwanesa	cuernos	5	1	12	1.2
9	tradicional	hembra	2	1	1	5
10	tradicional	hembra	3	1	2	2.7
11	tradicional	hembra	4	1	4	2
12	tradicional	hembra	5	1	6	1.8
13	tradicional	cuernos	2	1	1	5
14	tradicional	cuernos	3	1	1	6.5
15	tradicional	cuernos	4	1	4	2
16	tradicional	cuernos	5	1	4	2.5
1	taiwanesa	hembra	2	2	1	5
2	taiwanesa	hembra	3	2	2	2.5
3	taiwanesa	hembra	4	2	7	1.5
4	taiwanesa	hembra	5	2	9	1.6
5	taiwanesa	cuernos	2	2	2	3
6	taiwanesa	cuernos	3	2	5	1.5
7	taiwanesa	cuernos	4	2	12	5
8	taiwanesa	cuernos	5	2	13	2.2
9	tradicional	hembra	2	2	1	2.1
10	tradicional	hembra	3	2	2	1.5
11	tradicional	hembra	4	2	4	5.5
12	tradicional	hembra	5	2	6	1.5
13	tradicional	cuernos	2	2	1	2.5
14	tradicional	cuernos	3	2	3	1.5
15	tradicional	cuernos	4	2	4	2.5
16	tradicional	cuernos	5	2	5	1.7
1	taiwanesa	hembra	2	3	1	5.5
2	taiwanesa	hembra	3	3	2	3.2
3	taiwanesa	hembra	4	3	8	1.2
4	taiwanesa	hembra	5	3	9	1
5	taiwanesa	cuernos	2	3	2	2
6	taiwanesa	cuernos	3	3	6	1.2
7	taiwanesa	cuernos	4	3	10	1.9
8	taiwanesa	cuernos	5	3	10	2.2
9	tradicional	hembra	2	3	1	6
10	tradicional	hembra	3	3	3	1.8
11	tradicional	hembra	4	3	4	2.6
12	tradicional	hembra	5	3	5	2.1
13	tradicional	cuernos	2	3	1	6.5
14	tradicional	cuernos	3	3	3	2.5

CONTINUACION CUADRO 6A.

TRATAMIENTO	METODOLOGIA	CULTIVAR	NIVEL DE BENCILAMINOPURINA	BLOQUES	NUMERO DE BROTES	LONGITUD BROTES
15	tradicional	cuernos	4	3	3	1.8
16	tradicional	cuernos	5	3	6	1.5
1	taiwanesa	hembra	2	4	1	5
2	taiwanesa	hembra	3	4	3	2
3	taiwanesa	hembra	4	4	9	1.5
4	taiwanesa	hembra	5	4	8	1.5
5	taiwanesa	cuernos	2	4	2	2.9
6	taiwanesa	cuernos	3	4	4	1.3
7	taiwanesa	cuernos	4	4	12	1.7
8	taiwanesa	cuernos	5	4	9	2
9	tradicional	hembra	2	4	1	5
10	tradicional	hembra	3	4	2	2.5
11	tradicional	hembra	4	4	6	1.5
12	tradicional	hembra	5	4	4	2
13	tradicional	cuernos	2	4	1	5
14	tradicional	cuernos	3	4	2	3.5
15	tradicional	cuernos	4	4	4	2
16	tradicional	cuernos	5	4	5	2
1	taiwanesa	hembra	2	5	1	4.5
2	taiwanesa	hembra	3	5	2	3
3	taiwanesa	hembra	4	5	10	1
4	taiwanesa	hembra	5	5	9	0.7
5	taiwanesa	cuernos	2	5	2	1.5
6	taiwanesa	cuernos	3	5	2	2.5
7	taiwanesa	cuernos	4	5	13	2.5
8	taiwanesa	cuernos	5	5	12	1
9	tradicional	hembra	2	5	1	1.5
10	tradicional	hembra	3	5	2	6.5
11	tradicional	hembra	4	5	4	2.2
12	tradicional	hembra	5	5	5	2.5
13	tradicional	cuernos	2	5	1	2
14	tradicional	cuernos	3	5	2	6
15	tradicional	cuernos	4	5	4	2.5
16	tradicional	cuernos	5	5	5	1.7
1	taiwanesa	hembra	2	6	0	0
2	taiwanesa	hembra	3	6	2	2.8
3	taiwanesa	hembra	4	6	10	1.6
4	taiwanesa	hembra	5	6	8	1.5
5	taiwanesa	cuernos	2	6	0	0
6	taiwanesa	cuernos	3	6	3	2.1
7	taiwanesa	cuernos	4	6	10	1.9
8	taiwanesa	cuernos	5	6	11	1.6
9	tradicional	hembra	2	6	1	7
10	tradicional	hembra	3	6	2	2.7
11	tradicional	hembra	4	6	4	2
12	tradicional	hembra	5	6	6	1.7
13	tradicional	cuernos	2	6	1	5
14	tradicional	cuernos	3	6	2	2.5
15	tradicional	cuernos	4	6	4	2.5
16	tradicional	cuernos	5	6	5	1.7

CONTINUACION CUADRO 6A.

TRATAMIENTO	METODOLOGIA	CULTIVAR	NIVEL DE BENCILAMINOPURINA	BLOQUES	NUMERO DE BROTES	LONGITUD BROTES
1	taiwanesa	hembra	2	7	0	0
2	taiwanesa	hembra	3	7	2	2.8
3	taiwanesa	hembra	4	7	11	1.7
4	taiwanesa	hembra	5	7	8	1.7
5	taiwanesa	cuernos	2	7	2	2.7
6	taiwanesa	cuernos	3	7	4	1.2
7	taiwanesa	cuernos	4	7	11	1.6
8	taiwanesa	cuernos	5	7	13	1.7
9	tradicional	hembra	2	7	1	5
10	tradicional	hembra	3	7	0	0
11	tradicional	hembra	4	7	4	2.5
12	tradicional	hembra	5	7	5	2
13	tradicional	cuernos	2	7	1	6.5
14	tradicional	cuernos	3	7	3	1.7
15	tradicional	cuernos	4	7	3	2.5
16	tradicional	cuernos	5	7	5	1.8
1	taiwanesa	hembra	2	8	1	5
2	taiwanesa	hembra	3	8	3	2
3	taiwanesa	hembra	4	8	9	1.5
4	taiwanesa	hembra	5	8	10	1.7
5	taiwanesa	cuernos	2	8	2	2.7
6	taiwanesa	cuernos	3	8	5	1
7	taiwanesa	cuernos	4	8	12	1.6
8	taiwanesa	cuernos	5	8	12	1.7
9	tradicional	hembra	2	8	1	6
10	tradicional	hembra	3	8	2	2.5
11	tradicional	hembra	4	8	5	2
12	tradicional	hembra	5	8	5	2
13	tradicional	cuernos	2	8	1	7
14	tradicional	cuernos	3	8	2	2.5
15	tradicional	cuernos	4	8	4	2
16	tradicional	cuernos	5	8	4	2
1	taiwanesa	hembra	2	9	1	4
2	taiwanesa	hembra	3	9	2	3
3	taiwanesa	hembra	4	9	8	1.2
4	taiwanesa	hembra	5	9	7	1.2
5	taiwanesa	cuernos	2	9	2	3.2
6	taiwanesa	cuernos	3	9	3	1.8
7	taiwanesa	cuernos	4	9	12	1.7
8	taiwanesa	cuernos	5	9	11	1.6
9	tradicional	hembra	2	9	1	7
10	tradicional	hembra	3	9	3	2.5
11	tradicional	hembra	4	9	4	1.6
12	tradicional	hembra	5	9	5	2
13	tradicional	cuernos	2	9	1	5
14	tradicional	cuernos	3	9	2	2.2
15	tradicional	cuernos	4	9	4	2
16	tradicional	cuernos	5	9	4	2.5
1	taiwanesa	hembra	2	10	1	4.5
2	taiwanesa	hembra	3	10	0	0

CONTINUACION CUADRO 6A.

TRATAMIENTO	METODOLOGIA	CULTIVAR	NIVEL DE BENCILAMINOPURINA	BLOQUES	NUMERO DE BROTES	LONGITUD BROTES
3	taiwanesa	hembra	4	10	10	1.6
4	taiwanesa	hembra	5	10	9	1.5
5	taiwanesa	cuernos	2	10	2	3.2
6	taiwanesa	cuernos	3	10	4	1.4
7	taiwanesa	cuernos	4	10	11	1.2
8	taiwanesa	cuernos	5	10	12	1.5
9	tradicional	hembra	2	10	0	0
10	tradicional	hembra	3	10	2	2.7
11	tradicional	hembra	4	10	6	1.7
12	tradicional	hembra	5	10	5	2
13	tradicional	cuernos	2	10	1	5
14	tradicional	cuernos	3	10	1	5
15	tradicional	cuernos	4	10	5	1.8
16	tradicional	cuernos	5	10	4	2

CUADRO 7A: Resumen del Análisis de Varianza para la variable número de brotes en distintos tratamientos en micropropagación de plátano.

COMBINACION	ALTURA EN CENTIMETROS	DESVIACION ESTANDAR
Taiwanesa- Cuernos- 5 mg/l de Ba	11.5	1.2692
Taiwanesa- Cuernos- 4 mg/l de BA	11.4	0.966
Taiwanesa- Hembra - 4 mg/l de BA	9	1.2472
Taiwanesa- Hembra - 5 mg/l de BA	8.7	0.9486
Tradicional- Hembra - 5 mg/l de BA	5.2	0.6324
Tradicional- Cuernos- 5 mg/l de BA	4.8	0.7881
Tradicional- Hembra - 4 mg/l de BA	4.5	0.8498
Taiwanesa- Cuernos- 3 mg/l de BA	4.1	1.1972
Tradicional- Cuernos- 4 mg/l de BA	4	0.666
Taiwanesa- Hembra- 3 mg/l de BA	2.3	0.5
Tradicional- Hembra - 3 mg/l de BA	2.2	0.44
Tradicional- Cuernos- 3 mg/l de BA	2.1	0.737
Taiwanesa- Cuernos- 2 mg/l de BA	2	0
Taiwanesa- Hembra - 2 mg/l de BA	2	0
Tradicional- Hembra- 2 mg/l de BA	2	0
Tradicional- Cuernos- 2 mg/l de BA	2	0

CUADRO 8A: Resumen del Análisis de Varianza para la variable longitud de brotes (cm), en distintos tratamientos en micropropagación de plátano. ICTA, Guatemala. 1998.

COMBINACION	ALTURA EN CENTIMETROS	DESVIACION ESTANDAR
Tradicional - Hembra - 2 mg/l de BA	5.83	0.866
Tradicional - Cuernos- 2 mg/l de BA	5.65	0.7835
Taiwanesa - Hembra - 2 mg/l de BA	4.68	0.53
Tradicional - Cuernos- 3 mg/l de BA	3	1.565
Taiwanesa - Cuernos- 2 mg/l de BA	2.8	0.38
Taiwanesa - Hembra - 3 mg/l de BA	2.56	0.514
Tradicional - Hembra - 3 mg/l de BA	2.42	0.303
Tradicional - Cuernos- 4 mg/l de BA	2	0.296
Tradicional - Hembra - 4 mg/l de BA	2	0.386
Tradicional - Cuernos- 5 mg/l de BA	1.94	0.337
Tradicional - Hembra - 5 mg/l de BA	1.91	0.185
Taiwanesa - Cuernos- 5 mg/l de BA	1.65	0.279
Taiwanesa - Cuernos- 3 mg/l de BA	1.55	0.46
Taiwanesa - Cuernos- 4 mg/l de BA	1.54	0.3
Taiwanesa - Hembra - 5 mg/l de BA	1.5	0.228
Taiwanesa - Hembra - 4 mg/l de BA	1.48	0.187

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA



FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
AGRONOMICAS

Ref. Sem.032-99

LA TESIS TITULADA: "EFECTO DE LA BENCILAMINOPURINA (BA) Y DOS METODOS DE MICRO-PROPAGACION SOBRE DOS CULTIVARES DE PLATANO (Musa balbisiana colla)".

DESARROLLADA POR LA ESTUDIANTE: CLAUDIA IXMUCANE LOPEZ MORALES

CARNET No: 8313824

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Manuel Martínez Ovalle
Ing. Agr. José Humberto Calderón Díaz

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las normas Universitarias y Reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Domingo Amador Pérez
A S E S O R

Ing. Agr. Héctor Sagastume Mena
A S E S O R

Ing. Agr. Fernando Rodríguez B.
DIRECCION IIA.



IMPRIMASE

Ing. Agr. Rolando Lara Alecio
D E C A N O



cc:Control Académico
Archivo
FR/prr.

APARTADO POSTAL 1545 § 01091 GUATEMALA, C.A.
TELEFONO 476-9794 § FAX (502) 476-9770
E-mail: lia@usac.edu.gt § <http://www.usac.edu.gt/facultades/agronomia.htm>