

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



TEMA:
MULTIPLICACION *IN VITRO* DE PLATANO *Musa paradisiaca* (*var. curare enano*), A PARTIR DE APICES MERISTEMATICOS,
UTILIZANDO DOS CONCENTRACIONES DE 6- BENZILAMINOPURINA
Y DIFERENTES VOLUMENES DE SOLUCIÓN MADRE EN MEDIO
LIQUIDO

TRABAJO DE GRADUACIÓN
PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Br. JOSE ELIAS RUMALDO CHINCHILLA

DOCENTES DIRECTORES:

MSc. RICARDO FIGUEROA CERNA
Lic. KARLA MARIA QUINTANILLA MORENO

COORDINADOR GENERAL DE PROCESO DE GRADO:

MSc. RICARDO FIGUEROA CERNA

ENERO DE 2016

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTROAMÉRICA

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



RECTOR INTERINO

LICDO. JOSE LUIS ARGUETA ANTILLÓN

VICE-RECTOR ADMINISTRATIVO INTERINO

ING. CARLOS ARMANDO VILLALTA

SECRETARIA GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZA VALETA DE AMAYA

DEFENSORA DE LOS DERECHOS UNIVERSITARIOS

LICDA. CLAUDIA MARIA MELGAR DE ZAMBRANA

FISCAL GENERAL INTERINA

LICDA. NORA BEATRIZ MELENDEZ

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR, FACULTAD
MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE



DECANO INTERINO

ING. JORGE WILLIAM ORTIZ SÁNCHEZ

SECRETARIO INTERINO

LICDO. DAVID ALFONSO MATA ALDANA

JEFE DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA:

LIC. CARLOS MAURICIO LINARES HERNANDEZ

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD MULTIDISCIPLINARIA DE OCCIDENTE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



MULTIPLICACION *IN VITRO* DE PLATANO *Musa paradisiaca* (*var. curare enano*), A PARTIR DE APICES MERISTEMATICOS, UTILIZANDO DOS CONCENTRACIONES DE 6- BENZILAMINOPURINA Y DIFERENTES VOLUMENES DE SOLUCIÓN MADRE EN MEDIO LIQUIDO

TRABAJO DE GRADUACIÓN
PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Br. JOSE ELIAS RUMALDO CHINCHILLA

COORDINADOR GENERAL DE PROCESOS DE GRADO:

MSc. RICARDO FIGUEROA CERNA

FIRMA: _____

DOCENTES DIRECTORES:

MSc. RICARDO FIGUEROA CERNA

FIRMA: _____

Lic. KARLA MARÍA QUINTANILLA MORENO

FIRMA: _____

SANTA ANA

EL SALVADOR

CENTROAMÉRIC

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** primeramente, por ser el pilar que sostiene mi vida y todos mis ideales, ya que sin su infinita bondad nada podría ser posible.

A los docentes directores **MSc. Ricardo Figueroa Cerna** y **Lic. Karla María Quintanilla Moreno** por ser muy finos de su parte en compartir sus conocimientos y en guiarme en todo el proceso en el desarrollo de la investigación.

Al **Ing. Carlos Roberto Arévalo Alvarado** jefe del laboratorio de biotecnología y demás autoridades de CENTA, por brindarme su apoyo y haberme permitido realizar esta investigación en las instalaciones de dicho laboratorio.

A mi padre **Florentino Rumaldo**, por apoyarme siempre y estar junto a mí cuando lo necesito, por ser un excelente padre y darme la oportunidad de estudiar, a mi madre **María del Transito Chinchilla**, por ser la mejor del mundo y por desempeñar muy bien su rol y siempre apoyarme a lo largo de mi vida y carrera.

A mis suegros **Vilma Esperanza y Oscar Alfredo**, por su apoyo total en todo el proceso hasta culminar mis estudios.

A la señora **Irma y Carmen** por su valiosa colaboración en el laboratorio ya que en muchos momentos fueron quienes me guiaron.

A **GENSA** (Genética Salvadoreña S.A de C.V), puntualmente al **Ing. José Manuel Cuellar** e **Ing. Nelson Cuellar** por el importante aporte del material vegetal, ya que, sin su valiosa ayuda este trabajo no hubiese sido posible.

A toda la Universidad de El Salvador, en especial a los docentes del departamento de Biología de la FMOcc, que contribuyeron en mi formación académica.

DEDICATORIA

A DIOS, por su infinita misericordia quien ilumino mi camino para poder obtener este grado académico.

A mi hijo **Oscar José Rumaldo** por ser una de mis principales fuentes de motivación, que me ayudó a terminar con éxito esta investigación y que esta carrera sea tan solo la base de sus aspiraciones futuras.

A mi esposa **Jennifer Vanessa**, por animarme y su ejemplar perseverancia en sus luchas y por todo lo que significa en mi vida.

A mi **familia** esto como un sencillo reconocimiento por todos sus esfuerzos, por haberme dado el pan de la enseñanza y el don de la vida.

INDICE GENERAL

Contenido	Págs
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ABREVIATURA	xiii
GLOSARIO	xiv
RESUMEN	xvi
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	2
2.1 Antecedentes investigativos.....	2
2.2 Origen del plátano.....	3
2.3 Taxonomía.....	3
2.4 Variedad de plátano curare enano.....	4
2.5. Descripción de la variedad curare enano.....	4
2.6 Morfología del plátano.....	4
2.6.1 Planta.....	4
2.6.1.1 Sistema radicular.....	5
2.6.1.2 Pseudotallo.....	5
2.6.1.3 Hojas.....	5
2.6.1.4 Inflorescencia.....	6
2.6.1.5 Fruto.....	7
2.7. Cultivo <i>in vitro</i> de tejidos vegetales.....	7
2.8. Reproducción asexual del plátano.....	7
2.8.1. Propagación <i>in vitro</i>	7
2.8.2. El explante.....	8
2.8.3. Desinfección superficial del explante.....	8
2.8.4. Empleo de sustancias antioxidantes.....	10
2.9. Medios de cultivo.....	10

2.9.1. Reguladores de crecimiento.....	12
2.9.1.1. Auxinas.....	12
2.9.1.2. Citoquininas.....	13
2.9.2. Fuente de energía.....	13
2.9.3. Factores físicos que intervienen en el cultivo.....	14
3. DISEÑO METODOLOGICO.....	15
3.1. Tipo de investigación.....	15
3.2. Descripción del área de estudio.....	15
3.3. Universo población y muestra.....	15
3.3.1. Universo.....	15
3.3.2. Población.....	15
3.3.3. Muestra.....	15
3.4. Recolección de datos.....	16
3.4.1 Fase de campo.....	16
3.4.1.1 Obtención del material vegetal.....	16
3.4.1.2 Transporte del material vegetativo.....	16
3.4.2 Fase de laboratorio.....	16
3.4.2.1 Preparación de medios de cultivo.....	16
3.4.2.2 Etapa de multiplicación <i>in vitro</i>	17
3.4.2.2.1 Siembra del material vegetal.....	18
3.4.2.2.2 Ciclos de multiplicación.....	19
3.4.2.3 Diseño experimental.....	20
3.4.2.4 Variables evaluadas.....	20
3.4.2.4.1 Porcentaje de brotación.....	20
3.4.2.4.2 Porcentaje de explantes con brotes.....	21
3.5 Procesamiento y tabulación de datos.....	21
3.6 Análisis estadístico de los datos.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Porcentaje de brotación.....	22

4.1.1. Porcentaje de brotación ciclo 1.....	22
4.1.2. Porcentaje de brotación ciclo 2.....	23
4.1.3. Porcentaje de brotación para el total de resultados.....	24
4.2. Porcentaje de explantes con brotes.....	26
4.2.1. Porcentaje de explantes con brotes ciclo 1.....	26
4.2.2. Porcentaje de explantes con brotes ciclo 2.....	28
4.2.3. Porcentaje de explantes con brotes para el total de resultados	30
5. DISCUSION.....	34
5.1. Etapa de multiplicación.....	34
5.1.1. Porcentaje de brotes por explantes.....	34
5.1.2. Porcentaje de explantes con brotes.....	35
6. CONCLUSIONES.....	39
7. RECOMENDACIONES.....	40
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	41
ANEXOS	

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Págs.
1. Composición del medio formulado con las sales de Murashige & Skoog (1962).....	17
2. Tratamientos que se formularon en la fase de laboratorio.....	18
3. Análisis de varianza para porcentaje de brotación <i>in vitro</i> de los explantes de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (<i>var. curare enano</i>), a los 36 días (ciclo I) después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo....	22
4. Análisis de varianza para porcentaje de brotación <i>in vitro</i> de los explantes de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (<i>var. curare enano</i>), a los 54 días (ciclo II) después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo....	23
5. Análisis de varianza para porcentaje de brotación <i>in vitro</i> de los explantes de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (<i>var. curare enano</i>), al final de los dos ciclos de multiplicación.....	25
6. Análisis de varianza para porcentaje de explantes con brotes <i>in vitro</i> de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (<i>var. curare enano</i>), a los 36 días (ciclo 1) después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo....	26
7. Test de Duncan para los niveles de la concentración de 6-Benzilaminopurina evaluados en el ciclo 1 de la multiplicación...	26
8. Test de Duncan para los niveles de volumen nutritivo de medio evaluadas en el ciclo 1 de la multiplicación.....	26
9. Interacción entre los niveles de la concentración de 6-Benzilaminopurina y el volumen de medio nutritivo evaluados	

en el ciclo 1 de la multiplicación.....	27
10. Análisis de varianza para porcentaje de explantes con brotes <i>in vitro</i> de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (var. <i>curare enano</i>), a los 54 días (ciclo 2) después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo....	28
11. Test de Duncan para los niveles de la concentración de 6-benzilaminopurina evaluadas en el ciclo 2 de la multiplicación...	28
12. Test de Duncan para los niveles del volumen de medio nutritivo evaluadas en el ciclo 2 de la multiplicación.....	28
13. Interacción entre los niveles de concentración de 6-benzilaminopurina y el volumen de medio nutritivo evaluados en el ciclo 2 de la multiplicación.....	29
14. Análisis de varianza para porcentaje de explantes con brotes <i>in vitro</i> de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (var. <i>curare enano</i>), entre ciclo I y ciclo II.....	30
15. Test de Duncan para los niveles de la concentración de 6-benzilaminopurina evaluadas en la investigación.....	30
16. Test de Duncan para los niveles del volumen de medio nutritivo evaluadas en la investigación.....	30
17. Interacción entre los niveles de concentración de 6-benzilaminopurina y el volumen de medio nutritivo evaluados en esta investigación.....	31

INDICE DE FIGURAS

Figura	Págs.
1. Siembra del material vegetal en los medios nutritivos con sus respectivas concentraciones de BAP y volúmenes de medio, puesto en el agitador a 80 rpm.....	19
2. Porcentaje de brotación obtenido en el ciclo 1 en explantes de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (var. <i>curare enano</i>), en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo....	23
3. Porcentaje de brotación obtenido en el ciclo 2 en explantes de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (var. <i>curare enano</i>), en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo....	24
4. Porcentajes promedios de brotación <i>in vitro</i> en explantes de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (var. <i>curare enano</i>), a los 54 días de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.....	25
5. Porcentajes promedios de explantes con brotes en plátano <i>Musa paradisiaca</i> (var. <i>curare enano</i>), a los 36 días de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.....	27
6. Porcentajes promedios de explantes con brotes en plátano <i>Musa paradisiaca</i> (var. <i>curare enano</i>), a los 54 días de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.....	29
7. Porcentajes promedios de explantes con brotes de plátano <i>Musa</i>	

	<i>paradisiaca</i> (var. <i>curare enano</i>), a los 54 días de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo, tomando en cuenta los dos ciclos de cultivo.....	31
8.	Porcentajes por ciclo de promedios de brotes y explantes con brotes de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (var. <i>curare enano</i>), en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo, tomando en cuenta los dos ciclos de cultivo.....	32
9.	Porcentajes de tratamientos, en cuanto a promedios de brotes y explantes con brotes de plátano <i>Musa paradisiaca</i> (var. <i>curare enano</i>), en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo, al final de la investigación.....	33

ABREVIATURAS

- ABA:** Acido Abscísico.
AIA: Acido indol-3-acético.
AIB: Acido indol-3-butírico.
ANA: Acido α -Naftalenacético.
BAP: Bencil amino purina.
MS: Murashige y Skoog.

GLOSARIO

Agar: Polisacárido que por sus propiedades gelificantes, se utiliza en la preparación de medios nutritivos para cultivos.

Ápice meristemáticos: Explante que cuenta del domo meristemáticos acompañado generalmente por uno o varios primordios foliares.

Autoclave: Cámara cerrada que permite, mediante la aplicación de calor y vapor a presión, esterilizar distintos objetos y sustancias (material de laboratorio, líquidos, etc.)

Auxinas: Grupo de reguladores de crecimiento de plantas (naturales o sintéticos) que estimulan la división celular, alargamiento, dominancia apical, iniciación de la raíz y floración.

Cámara de crecimiento: Espacio cerrado donde se controlan las condiciones ambientales (temperatura, luz y humedad).

Citoquininas: Son un grupo de fitohormonas que regulan la división celular y la diferenciación en tejidos vegetales, participan en el control del desarrollo y la senescencia.

Cultivo aséptico: Estéril, libre de organismos contaminantes (bacterias y hongos).

Cultivo de tejidos: Tejidos u órganos en un medio con sustancias nutritivas bajo condiciones estériles y controladas.

Explante: Fragmento de una planta que se aísla y se prepara de forma aséptica para su cultivo en un medio nutritivo.

Fotoperiodo: Duración de la luz del día o periodo de iluminación diaria que se suministra para el crecimiento de las plantas.

Medio líquido: Son aquellos que no se les agrega ningún agente gelificante.

Medio semisólido: Son aquellos que se les ha agregado un agente gelificante como Agar o Phytigel.

Variación somaclonal: Son modificaciones genéticas en las células y los tejidos cultivados *In vitro*.

RESUMEN

Esta investigación se realizó, de Mayo a Octubre de 2015 en el Laboratorio de Biotecnología de Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” (CENTA)¹ del Ministerio de Agricultura y Ganadería km. 33 ^{1/2}, carretera Panamericana, cantón San Andrés, Municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad.

La investigación tuvo como objetivo la multiplicación *in vitro* de plátano *Musa paradisiaca* (*var. curare enano*), evaluando dos concentraciones de 6-Benzilaminopurina (Factor A) y tres volúmenes diferentes de medio nutritivo (Factor B) para comparar, cuál, de ellos tuvo efecto en la generación de brotes.

Se formularon 6 tratamientos, en donde, se utilizó ápices meristemáticos de tallo; a éstos se los colocó en frascos de 250 ml de capacidad con volúmenes de nutrimentos necesarios a evaluar de 20 ml, 30 ml y 40 ml, así mismo, las concentraciones de 6-Benzilaminopurina (3 mg/l; 5 mg/l) con un diseño completamente al azar (DCA), con arreglo factorial de 3 x 2.

Posteriormente, se replicaron los explantes por dos ciclos de cultivo, en donde, se evaluó el número de brotes que se regeneraron por explante y finalmente el porcentaje de explantes que originaron brotes se seleccionaron al azar 54 explantes (9 repeticiones por tratamientos).

El tratamiento T4 (5 mg/l de 6- Benzilaminopurina + 20 ml de medio nutritivo), aunque, no se encontró diferencia estadística significativa para la variable porcentaje de brotes por explantes fue el que mayor porcentaje de brotes presentó en esta investigación; pero, si se encontró diferencia estadística significativa para la variable porcentaje de explantes que originaron brotes

¹ Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal.

INTRODUCCION

En los países del istmo centroamericano se producen un grueso considerable de plátano que se comercializa en el mercado internacional, es el cuarto cultivo de frutas más importante a nivel mundial, ya que, sus consumidores lo aprecian como postre, pero, realmente forma parte de la dieta diaria de más de cien países tropicales y subtropicales.

El plátano es un cultivo muy importante, ya que, en países en vías de desarrollo es usado como materia prima como fuente de almidón, así mismo, lo utilizan como vegetal, producción de cerveza de bajo contenido alcohólico y alimento animal.

Por esta razón se está utilizando la propagación de plantas *in vitro*, que es una técnica de reproducción asexual muy útil para el apoyo al mejoramiento genético de un cultivo. En el cultivo de plátano, esta técnica permite la rápida propagación vegetativa del material genéticamente estable. También es ventajosa por la disminución del área necesaria para el establecimiento de vivero y en la reducción de costos de producción al tratarse de plantas resistentes y tolerantes a factores ambientales y biológicos

Se multiplico *in vitro* ápices meristemáticos de tallo de plátano *Musa paradisiaca* (*var. curare enano*), utilizando dos concentraciones de 6-benzilaminopurina y tres volúmenes diferentes de solución madre del medio de cultivo formulado por Murashige & Skoog (1962), evaluándolos en medio líquido para demostrar la eficacia de este en la etapa de multiplicación.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Antecedentes investigativos.

En Venezuela en una investigación que tuvo como objetivo la multiplicación *in vitro* del plátano Hartón Gigante" (*Musa AAB*), el cual, constituye un elemento básico en la dieta de la población y es uno de los renglones agrícolas más importantes. La investigación se ejecuto en la etapa de multiplicación de los brotes, se evaluaron dos consistencias de medios de cultivo en estado líquido con soporte Puente Héller (M1) y en estado sólido (M2). Estos medios estuvieron constituidos por las sales minerales de Murashige & Skoog (MS), en, donde, se evaluaron dos citocininas: BAP e Isopenteniladenina (2ip) en concentraciones de 2,5; 5,0 y 10,0 mg L⁻¹ y dos estados físicos del medio (líquido y sólido). La utilización de BAP en dosis de 5 y 10 mg L⁻¹ adicionada al medio líquido permitió incrementar el número de brotes por frasco; mientras que adicionada al medio sólido permitió el mayor crecimiento de los mismos (Florio *et al.*, 2010).

En Cuba se realizó una investigación con el cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa spp.*, AAB) en SIT. Se llevaron a cabo experimentos independientes y consecutivos, donde, se determinó el efecto del tiempo de inmersión, la frecuencia de inmersión, el volumen de medio de cultivo, se obtuvieron los mejores resultados con un tiempo de inmersión de 10 minutos, frecuencia de inmersión cada 6 horas, 40 ml de medio de cultivo por explante, 90 explantes por frasco de cultivo y 18 días de cultivo. El efecto del volumen de medio de cultivo por explante se comprobó mediante cuatro tratamientos (20, 30, 40 y 50 ml/explante) (Basail *et al.*, 2012).

En la universidad de Cauca Popayán se evaluó el efecto de la concentración hormonal en la generación de brotes al micropropagar plátano dominico hartón (Musa AAB Simmonds) con 10 tratamientos en un diseño completamente al azar (DCA). Se probaron tres concentraciones de BAP y AIA en arreglo factorial 3x3: 0.01; 0.5 y 5 mg/L. Los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p < 0.01\%$) en la etapa de multiplicación in vitro. Los resultados de la prueba de DMSt mostraron que el mayor número de brotes se produjo con las combinaciones 5 mg/L de BAP / 0.5 mg/L de AIA y 5 mg/L de BAP / 0.01 mg/L de AIA (Hoyos *et al.*, 2008)

2.2 Origen del plátano

Según IICA² (2008:4), el Plátano es una fruta cuyo origen se ubica en el Sureste Asiático, incluyendo el Norte de la India, Burma, Camboya y parte del sur de China, así como las Islas mayores de Sumatra, Java, Borneo, las Filipinas y Taiwán. Las más antiguas referencias relativas al cultivo del plátano proceden de la India, donde aparecen citas en la poesía épica del budismo primitivo de los años 500-600 antes de Cristo. Otra referencia encontrada en los escritos del budismo Jataka, hacia el año 350 a. C, sugiere la existencia, hace 2,000 años, de una fruta tan grande como colmillo de elefante.

2.3 Taxonomía

Izco *et al.*, (2004) & Zomlefer, (1994) reportan la siguiente clasificación taxonómica para las Musaceae.

Reino:..... Plantae
División:..... Magnoliophyta
Subclase: Zingiberidae
Clase:..... Liliopsida
Orden:..... Zingiberales

² Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.

Familia:..... Musaceae.

Género:..... *Musa*

2.4 Variedad de plátano curare enano

El plátano curare enano se caracteriza por ser precoz, de porte bajo y grueso, resistente a los vientos fuertes; es más rendidor, alcanzando en promedio 60 unidades por racimo (máximo 70, mínimo 50), lo que lo hace muy aceptado para exportación; sin embargo es susceptible a las malas condiciones de manejo tales como falta de agua y fertilización (Solórzano, 2012).

2.5 Descripción de la variedad Curare Enano

Es una planta de 1.90 hasta 2.25 m de altura, desarrolla un racimo que puede tener entre 54 y 60 dedos, dependiendo de las condiciones agronómicas en que se desarrolla y sufre estrés bajo condiciones de exceso o déficit hídrico (Solórzano, 2012).

Los suelos aptos para el desarrollo de ésta variedad son los franco-arenosos o franco-arcillosos. Los suelos con alto porcentaje de arenas hacen que las plantas se desarrollen raquíticamente y que los racimos reduzcan su longitud y calibre en los dedos. El tamaño de sus dedos como máximo se han encontrado entre 30 y 33 cm de longitud (desde el cuello hasta la punta) y el mínimo 26 centímetros (Solórzano, 2012).

2.6 Morfología del plátano

2.6.1 Planta

El plátano es un arbusto perenne de 2 a 8 m de altura. Tiene un rizoma o carneo basal que produce raíces adventicias y un pseudotallo formado por los pecíolos superpuestos de las hojas (Solórzano, 2012).

El verdadero tallo subterráneo se le denomina cormo, rizoma o bulbo, es carnoso y de él se desarrollan numerosas yemas laterales denominadas hijos o

retoños, que si se dejan constituyen nuevas plantas que sirven para ir sustituyendo a la que han producido sus frutos. Los rizomas o cormos sirven también para iniciar nuevas plantaciones. (Guerra, 1998).

2.6.1.1 Sistema radicular

Las raíces adventicias son blancas y tiernas en un principio, luego se vuelven amarillas y se endurecen a medida que van envejeciendo. Las raíces se originan de la parte superior del cormo, inmediatamente debajo de la inserción de las hojas, y su número disminuye hacia la parte inferior (Guerra, 1998).

Son en forma de cordón y aparecen en grupos de tres a cuatro, miden de 5 a 10 mm de grosor y pueden alcanzar una longitud de más de 5 m sino son destruidas. Las raíces laterales o secundarias se originan de las raíces adventicias que pueden medir 0.5 mm de grosor y tener de 3 a 15 cm de largo y de esas raíces se pueden tener otras raicillas o pelos absorbentes (Solórzano, 2012).

2.6.1.2 Pseudotallo

Se origina a partir del tallo que es un rizoma cónico, carnoso, en el cual se insertan las bases superpuestas para formar el pseudotallo. (FHIA, 1995)

2.6.1.3 Hojas

De muy grandes, de 2.0 a 4.0 m de largo y hasta de medio metro de ancho, con un pecíolo de 1.0 m o más de longitud y limbo elíptico alargado, ligeramente decurrente hacia el pecíolo, un poco ondulado y glabro. Cuando son viejas se rompen fácilmente de forma transversal por el azote del viento. De la corona de hojas sale, durante la floración, un escapo pubescente de 5.0 a 6.0 cm de diámetro, terminado por un racimo colgante de 1.0 a 2.0 m de largo (Solórzano, 2012).

Éste lleva una veintena de brácteas ovales alargadas, agudas, de color rojo púrpura, cubiertas de un polvillo blanco harinoso; de las axilas de estas brácteas nacen a su vez las flores. Durante el desarrollo de la planta se observan varios tipos de hojas:

- Hojas rudimentarias.
- Hojas estrechas ensiformes.
- Hojas anchas o verdaderas.
- Hoja verdadera: Se compone de vaina, pecíolo, lámina, vena central y
- apéndice.(FHIA, 1995)

2.6.1.4 Inflorescencia

Solórzano (2012), sostiene que después de algunos cambios fisiológicos da formación al racimo. La inflorescencia se empieza a formar cuando la planta ha emitido el 50% (19+/- 2), de sus hojas totales (38 +/- 2).

Existen dos tipos de flores:

- Flor femenina: cuyo ovario se transforma en plátano.
- Flor masculina: de ovario reducido y estambres bien desarrollados

Según Grajeda (2001), las partes de la inflorescencia son las siguientes:

Bellota, chira, bacota, popocha: dentro de la bellota se forman los tallos y los dedos del racimo, los cuales se van exponiendo al ir abriendo las brácteas.

Pinzote, raquis, tallo, garrote: el pinzote es la parte en donde van agarradas las manos y dedos del racimo.

Dedos (piezas florales): Hay flores femeninas y son las que se engrosan (las que comúnmente conocemos como dedos) y flores masculinas que forman la mano falsa, la mano de mono y los demás dedos que no engrosan. En

promedio un tallo de curare enano, produce 45-60 dedos, dependiendo del tipo de suelo, condiciones climáticas y manejo agrícola.

2.6.1.5 Fruto

Oblongo, de la forma de un pepino triangular, al principio verde y amarillo en la maduración, y cuando empieza a ennegrecerse, cae de la planta (Guerra, 1998).

2.7 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

Es un conjunto de técnicas con las que se ejerce un control relativo sobre procesos morfo génicos, fisiológicos que se llevan a cabo en los tejidos en estudio, en donde se cultiva un explante con potencialidad de diferenciación bajo condiciones asépticas en presencia de nutrientes y reguladores de crecimiento se tiene la capacidad de regenerar no solo tejidos y órganos sino también plantas completas (Esquivel & Escalant 1994, cit por López 2013), La técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales es una secuencia de sucesos compuesta principalmente de tres etapas: Etapa I: el establecimiento aséptico del cultivo primario; Etapa II: Multiplicación de brotes; Etapa III: enraizamiento y preparación del inoculo para su trasplante a suelo (Roca & Mroginski, 1991: Villalobos & Thorpe, 1991).

2.8 Reproducción asexual del plátano

2.8.1 Propagación *in vitro*

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que en general, varias células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo completo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Esta capacidad se denomina totipotencialidad celular. El cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denominará explante, como por ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristema,

embrión, nudo, semilla, antera, etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (Dublin,1993).

Las técnicas de propagación *in vitro* se basan en el concepto de totipotencia celular, enunciado desde 1902 por Haberlandt. La célula como unidad morfológica y fisiológica del ser viviente, es capaz de autonomía, ya que posee toda la información genética necesaria para generar una nueva planta, siempre y cuando se le suministren las condiciones necesarias para su desarrollo (Etienne *et al.*, s.a cit por Landaverde *et al.*, 2002). Las diferentes posibilidades que ofrece el cultivo *in vitro* son: La obtención de haploides, obtención de plantas libres de virus, e hibridación somática. Además la multiplicación vegetativa es el único procedimiento para reproducir a gran escala los genotipos sobresalientes, cuya fijación por vía sexual no pueden considerarse por diversas razones, como la incompatibilidad y la depuración genética prolongada (Berthouly, 1989).

2.8.2 El explante

Es una parte de un tejido o de un órgano que se aísla del resto de la planta con fines de cultivo, la elección de un explante constituye el paso para el establecimiento de los cultivos, puede ser un fragmento de cualquier parte de la planta, (Roca & Mroginski, 1991, cit por López, 2013) al ser un método de clonación la planta madre debe reunir ciertas características como: tamaño, edad fisiológica y planta donante, además la elección de un explante apropiado es el primer paso para el establecimiento de un cultivo y a la vez está determinado por el objetivo perseguido y de la especie vegetal en estudio (Castillo s.a, cit por Quintanilla, 2003).

2.8.3 Desinfección superficial del explante

Las plantas normalmente se encuentran contaminadas por microorganismos que no son patógenos bajo condiciones normales. Sin embargo, cuando el tejido o el órgano es cultivado *in vitro* el crecimiento de los microorganismos

limita el desarrollo de las células. Los que trabajan con tejidos adultos de plantas que crecen en el campo, señalan que el porcentaje de contaminación es alto, haciéndose necesaria la estricta desinfección superficial (Landaverde *et al.*, 2002).

Este material recibe una primera desinfección con un blanqueador comercial sin diluir (5,25% de hipoclorito de sodio) durante 20 minutos, seguido de por dos lavados con agua esterilizada durante 5 minutos cada uno. En condiciones asépticas se reduce el tamaño del material hasta unos 2 cm aproximadamente. Seguidamente se realiza una segunda desinfección por espacio de 10 minutos con hipoclorito de sodio al 10% v/v más dos gotas de surfactante Tween 20 por cada 100 ml de solución desinfectante. Se practican dos lavados de 3 minutos cada uno con agua estéril y se procede a reducir el tamaño hasta obtener un ápice aproximadamente 5 mm de longitud (Sandoval, 1991).

La concentración más liviana de desinfectante que sea efectiva contra la contaminación de determinado explante es la más adecuada, si es más diluida que esta, no se eliminarán los microorganismos y si es más concentrada se dañará el explante. Para facilitar la limpieza del explante es importante considerar que los brotes nuevos sean más limpios que los viejos, materiales que crecen en el invernadero son más limpios que los que se encuentran en el campo, y entre más pequeño sea el explante a introducir al cultivo *in vitro* menor será la contaminación a eliminar. Otra recomendación que se ha formulado es el uso de antioxidantes si se observa coloración café en el explante durante el proceso de desinfección. (Abdelhour *et al.*, 1994).

Por lo general para esterilizar los medios de cultivo se hace en autoclave a una presión de 115 Lb y 121 °C de temperatura por 20 minutos. La cristalería debe lavarse con detergentes que sean fáciles de remover con agua, se recomienda que para cristalería que haya estado en contacto con altas concentraciones de hormonas u otros agentes se enjuaguen con etanol 70%

antes de lavarlos con detergente, y por ultimo un lavado con agua estéril (Abdelnour *et al.*, 1994). Para los instrumentos metálicos como pinzas, bisturíes etc. la técnica comúnmente utilizada para esterilización es el flameo, los instrumentos se sumergen en alcohol 90% y se flamean, para esterilizar otros instrumentos como cajas de petri o papel se utiliza el autoclave.

2.8.4 Empleo de sustancias antioxidantes

Estas se utilizan en tres momentos principales: a) en forma de aspersión o en inmersión del explante recién aislado de la planta donadora y hasta el inicio del proceso de desinfección, b) luego del proceso de desinfección o c) agregado al medio de cultivo. Los antioxidantes más empleados, para el cultivo de células vegetales *in vitro*, son el ácido ascórbico (AA), ácido cítrico (AC) y la cisteína (CIS), ya sea solos o en mezcla. La oxidación de explantes, en varias especies vegetales, disminuye o se evita si éstos, luego de su establecimiento *in vitro*, son puestos a crecer en una condición de oscuridad por algunas semanas. Posteriormente, los explantes se transfieren a un ambiente con luz normal, o en ciertas ocasiones, a una condición de baja luminosidad (George 1996, cit por Azofeifa, 2009).

2.9 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son combinaciones de sustancias químicas, que los investigadores han descrito después de numerosos experimentos los cuales proporcionan al cultivo *in vitro* una dieta balanceada de nutrientes y hormonas, para mantener su viabilidad, estimular su diferenciación y regular su crecimiento (Abdelnour *et al.*, 1994).

Desde 1940 se han desarrollado una gran cantidad de trabajos sobre los requerimientos nutricionales de los tejidos de las plantas en medios estrictamente definidos. La mayoría de tejidos se pueden cultivar exitosamente en un medio completamente definido, mientras otros no presentan crecimiento

en soluciones salinas relativamente simple (CIAT 1993, cit por Landaverde *et al.*, 2002).

Existe una variedad de fórmulas de sales minerales que se utilizan en el cultivo de tejidos vegetales; estas fórmulas generalmente recibieron su nombre de investigadores como por ejemplo: Las sales minerales de Murashige *et. al* (1962) BMS, las sales minerales de White BW, las sales de Shenk y Hildebrandt (1972) BSH, Heller CH, Erickson (ER), Lins - maierkoop (LS), BS de Gambor etc (CIAT 1993, cit por Landaverde *et al.*, 2002).

El medio de cultivo consiste de un 95% de agua, macronutrientes y micronutrientes, reguladores de crecimiento, vitaminas, azúcares y en algunos casos agentes gelificantes. Así mismo el medio puede incluir aminoácidos, antibióticos o complejos naturales, la selección o desarrollo de un medio de cultivo es vital para el éxito en cultivo de tejidos (Trigiano 2000, cit por Flores, 2001).

El medio MS (Murashige & Skoog 1962) es el más popular entre todos los medios. Hay especies que crecen bien sobre un amplio rango de medios de cultivo por lo que no es preciso optimizar un medio para estos. Hay casos donde la selección de un genotipo conveniente es más importante que precisar la optimización de un medio de cultivo (Bonga & Von Aderkas 1992, cit por Flores, 2001).

Para el cultivo de tejidos se hace necesario la aplicación de sales inorgánicas al medio de cantidades importantes de macronutrientes como sales de Nitrógeno, Potasio, Calcio, Fósforo, Magnesio y Azufre y micronutrientes como sales de Hierro, Magnesio, Zinc, Boro, Cobre, Molibdeno, Iodo y Cobalto (Abdelnour *et al.*, 1994).

2.9.1 Reguladores de crecimiento

Son compuestos orgánicos diferentes de los nutrientes, que en pequeñas cantidades fomentan, inhibe o modifican el desarrollo de las plantas, y se dividen en dos grandes grupos: reguladores naturales y sintéticos, los primeros se encuentran presentes en las plantas mientras que los sintéticos son compuestos artificiales obtenidos por síntesis química (CATIE, 1987).

El crecimiento normal de la planta está determinado de forma armónica por reguladores que funcionan como hormonas, los principales grupos de reguladores son: Auxinas, Giberelinas, Citoquininas, Etileno e inhibidores de crecimiento, sus concentraciones varían de acuerdo al estado de desarrollo de la planta (Coto, 2007).

Las sustancias hormonales críticas en el cultivo de tejidos son las auxinas y Citoquininas. Estas intervienen en la elongación y división celular y en la germinación de la semilla. Entre las auxinas más utilizadas en el cultivo de tejidos se encuentran el Ácido Indolacético (AIA), Ácido Naftalenacético (ANA), 2,4-D, Picloram. Entre las citoquininas se encuentran: Benzilaminopurina (BAP), la Kinetina y Zeatina (Abdelnour *et al.*, 1994).

2.9.1.1 Auxinas

Las auxinas juegan un rol importante en muchos procesos de desarrollo, incluyendo alargamiento celular, dominancia apical, formación de raíces adventicias e inducción de embriogénesis somática. Generalmente, cuando la concentración es baja, la iniciación de raíces es favorecida y cuando la concentración es alta, ocurre la formación de callo. Las auxinas sintéticas más comúnmente usadas son el ácido Naftalenacético (ANA), el ácido 2,4 diclorofenoxiacético-(2,4-D), ácido-4-amino-3,5,6-Tricloro-2-Pirimidicocarboxílico (Picloram). En forma natural se producen el ácido indolacético (AIA) y el ácido indolbutírico (AIB) que son también frecuentemente usados (Flores, 2001).

2.9.1.2 Citoquininas

Las citoquininas se sintetizan en la planta generalmente en las semillas, frutos y sobre todo en las raíces, no presentan desplazamiento es decir no se desplazan del sitio de síntesis. Dentro de las Citoquininas naturales se tienen la Zeatina y la 2 isopentil- adenina (2IP) y el 6-benzilaminopurina (BAP), y en las sintéticas las más comunes son la Kinetina y el Benziladenina (BA) (CATIE, 1987).

Estas han recibido mucha atención que se consideran estimuladoras de la división celular, inducen la organogénesis estimulan el rompimiento de la latencia de las yemas axilares, el ácido Benzilaminopurina (BAP) es un compuesto muy activo y es el más utilizado debido a su disponibilidad y a un costo razonable (Roca & Mrogonski 1991, cit por Quintanilla, 2003).

2.9.2. Fuente de energía

Originalmente las plantas pueden producir azúcar como fuente de energía a través de la fotosíntesis, sin embargo, las vitroplantas casi no realizan fotosíntesis debido a la baja intensidad de luz en la que se desarrollan, y aunque lo hagan, producen muy poca azúcar. A causa de esto es necesario adicionar cierta cantidad de azúcar como fuente de energía al medio nutritivo (Usui *et al.*, 1996).

Otros componentes que se han adicionado ocasionalmente a los medios de cultivo son: agua de coco, glicina, sustancias antioxidantes como ácido ascórbico y la adición de carbono activado al medio de cultivo ha demostrado ser útil en varios cultivos posiblemente al absorber metabólicos tóxicos para los explantes (Roca & Mroginsky, 1991).

Otros de los factores que intervienen en el cultivo de tejidos son el pH del medio, la temperatura, humedad, luz y el intercambio gaseoso (Aldenour *et al.* 1994). Es suficiente decir que una especie en particular puede reaccionar

favorablemente a un conjunto de condiciones, mientras que en otros pueden no hacerlo; por consiguiente la tarea de decidir las condiciones de cultivo adecuadas pueden requerir en algunos casos, una decisión por el método de ensayo y error (CIAT 1993, cit por Landaverde *et al.*, 2002).

2.9.3 Factores físicos que intervienen en el cultivo de tejidos

Según Esquivel & Escalante 1994, cit por López (2013), los factores físicos que intervienen en el cultivo de tejidos con mayor impacto son:

La luz, en condiciones *in vitro*, la intensidad y cantidad de luz es muy baja en comparación con condiciones naturales por lo que se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de onda, el espectro útil para los vegetales es de 400 a 700 nanómetros.

El pH, la acidez o alcalinidad del medio de cultivo es importante y diferente para cada tipo de planta, por lo que se hace necesario ajustarlo a los requerimientos de cada especie, sin embargo el pH adecuado para las plantas generalmente oscila entre 4.5 a 7.0

La humedad, en condiciones *in vitro* la humedad dentro de los recipientes es cercana al 100%, por lo que la planta *in vitro* no desarrolla un adecuado sistema de regulación hídrica.

3. DISEÑO METODOLOGICO

3.1 Tipo de investigación

El método que se utilizó en esta investigación tuvo un enfoque cuantitativo-descriptivo ya que se realizó medición numérica y posteriormente un análisis comparativo, donde se midieron y evaluaron diferentes variables tales como, número de brotes por explantes y porcentaje de explantes con brotes, para responder las preguntas de la investigación; el tipo de investigación fue experimental, descriptivo - comparativo ya que permitió el manejo intencional de las variables (Hernández *et al.*, 2010).

3.2 Descripción del área de estudio

La investigación se realizó, de Mayo a Octubre de 2015 en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova” del Ministerio de Agricultura y Ganadería km. 33 ^{1/2}, carretera Panamericana, cantón San Andrés, municipio de Ciudad Arce, departamento de La Libertad.

3.3 Universo población y muestra.

3.3.1 Universo

Fueron todas las Musáceas que se encontraron en el departamento de Santa Ana.

3.3.2 Población

Fue todo el material vegetativo de plátano de la variedad curare enano que se encontraba en los laboratorios de Genética Salvadoreña S.A de C.V (GENSA)³.

3.3.3 Muestra

Fueron los 60 explantes de plátano de la variedad curare enano que se extrajeron de la población para desarrollar la investigación.

³ Genética Salvadoreña S.A de C.V

3.4 Recolección de datos

3.4.1 Fase de campo

3.4.1.1 Obtención del material vegetativo

El material vegetativo de plátano *Musa paradisiaca* (*var. curare enano*), que se utilizó en la investigación se obtuvo de (GENSA S.A de C.V), la cual, aportó 15 frascos cada uno de ellos con 4 masivos listos para ser multiplicados haciendo un total de 60 explantes, los cuales, fueron tratados en la etapa de inducción a brotación con 6-Benzilaminopurina como fitohormona a una concentración de 5 mg/l de la misma.

3.4.1.2 Transporte del material vegetal

Los explantes fueron trasladados a las instalaciones del CENTA, a la cámara de crecimiento del material en propagación (Anexo 1), en donde, se les renovó el medio nutritivo, para que los explantes se desarrollen mejor en un medio fresco y aumentar el número de los mismos. El medio al cual, se trasladó es el de sales minerales de Murashige & Skoog (1962) suplementado con 5 mg/l de 6- Benzilaminopurina, 2.5 g/l de fitagel y 30 g/l de azúcar blanca común.

3.4.2 Fase de laboratorio

3.4.2.1 Preparación de medios de cultivo

Para la preparación de medios de cultivo se utilizó soluciones madres que conforman el medio de cultivo formulado con sales de Murashige & Skoog (1962) compuesto por macronutrientes, micronutrientes, vitaminas suplementado con reguladores de crecimiento y azúcar como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Composición del medio nutritivo formulado con sales de Murashige & Skoog (1962).

N.	Componentes	Concentración	mg/l	Cantidad requerida para un litro de medio
I	Nitrato de amonio (NH ₄ NO ₃)	100X	1650	10 ml/l
II	Nitrato de potasio (KNO ₃)	100X	1900	10 ml/l
III	Cloruro de calcio (CaCl ₂)	100X	440	10 ml/l
IV	Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	100X	370	10 ml/l
V	Fosfato de potasio (KPO ₄)	100X	170	10 ml/l
VI	Hierro(FeSO ₄)	100X	27.8	10 ml/l
VII	Microelementos		Mg/l	10 ml/l
	H ₃ BO ₃	100X	6.2	
	MnSO ₄ H ₂ O	100X	22.3	
	ZnSO ₄ 7H ₂ O	100X	8.6	
	KI	100X	0.83	
	NaMoO ₄ 2H ₂ O	100X	2.5	
	CuSO ₄ 5H ₂ O	100X	0.025	
	CoCl ₂ 6H ₂ O	100X	0.025	
	Na ₂ EDTA ₂ H ₂ O	100X	37.4	
VIII	Vitaminas		Mg/l	10 ml/l
	Glicina	100X	2	
	Acido nicotínico	100X	0.5	
	Piridoxina	100X	0.5	
	Mioinositol	100X	100	
	Tiamina	100X	0.1	
IX	Azúcar blanca comercial.			30 g/l

Fuente: Sandoval (1991)

3.4.2.2 Etapa de multiplicación *in vitro*

La investigación se ejecutó en la etapa de multiplicación del material vegetativo, para conocer la interacción de los explantes con el medio nutritivo. Se evaluaron 6 tratamientos con 2 concentraciones diferentes de 6-Benzilaminopurina 3 mg/l y 5 mg/l, así mismo, se evaluaron 3 volúmenes diferentes de medio de Murashige & Skoog (1962) de 20 ml, 30 ml y 40 ml respectivamente para cada explante, para todos los tratamientos se realizaron 9

repeticiones, cada repetición formada por un frasco erlenmeyer con un explante cada uno (Cuadro 2)

Cuadro 2: Tratamientos que se formularon en la fase de laboratorio.

Concentración BAP / Volumen de Medio	3 mg/litro.	5 mg/litro.
V1= 20ml	T1= 3mg/l + V ₁	T4= 5mg/l + V ₁
V2= 30ml	T2= 3mg/l + V ₂	T5= 5mg/l + V ₂
V3= 40ml	T3= 3mg/l + V ₃	T6= 5mg/l + V ₃

Los explantes se cultivaron en los medios inorgánicos nutritivos elaborados con las soluciones madres formuladas por Murashige & Skoog (1962), posteriormente se agregó en los beakers de 1000 ml la fitohormona 6-Benzilaminopurina ya sea 3 mg/l o 5 mg/l y se pesó con una balanza analítica 30 g/lit de azúcar blanca como fuente de carbono adicionada al medio, el pH del medio se ajustó a 5.8 con la adición de NaOH y HCl 0.1 N, esto se realizó con la ayuda del potenciómetro antes de colocar las alícuotas correspondientes en los recipientes de cultivo (Sandoval, 1991). Posteriormente se utilizó erlenmeyer de 250 ml de capacidad, en donde, se dispense en cada uno de ellos ya sea 20 ml, 30 ml o 40 ml de volumen del medio de cultivo líquido previamente esterilizado en autoclave "YANG TA MIN ®" con su respectiva concentración de 6-Benzilaminopurina, para evitar la contaminación por bacterias u hongos dentro de los erlenmeyer a estos se les coloco papel aluminio (Florio *et al.*, 2010) (Anexo 2).

3.4.2.2.1 Siembra del material vegetal

En la cámara de flujo laminar, se tomó el ápice meristemático de tallo y con el bisturí se le realizo dos cortes verticales, lo más centrados posibles, con la finalidad de herir el meristemo. En esta etapa los explantes permanecieron en

condiciones de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad por 54 días mediante un control automatizado.

Para la agitación de las unidades experimentales se utilizó un agitador (Marca, BIGGERBILL THERMOLYNE capacidad de revolución de 450 rpm con una superficie de 66 cm x 54 cm (Anexo 3) para garantizar la permanente homogenización del medio y facilitar la difusión de fenoles en el mismo. El agitador permaneció a 80 rpm, para conocer el potencial de generación de brotes, por medio de la observación, en cuanto a la generación de brotes y porcentaje de explantes con brotes (Figura 1).

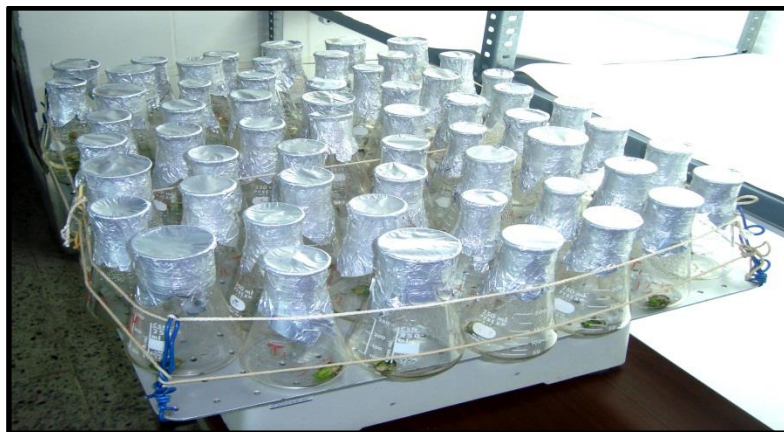


Fig. 1. Siembra del material vegetal en los medios nutritivos con sus respectivas concentraciones de 6- Benzilaminopurina y volúmenes de medio, puesto en el agitador a 80 rpm.

3.4.2.2 Ciclos de Multiplicación

La investigación consistió en 2 ciclos de multiplicación o subcultivos, los cuales, se realizaron cada 18 días, Para la siembra de los explantes se utilizó 54 erlenmeyer de 250 ml, teniendo cuidado de colocar los explantes en el tratamiento correspondiente con su respectiva concentración de 6- Benzilaminopurina y volumen de medio basal.

La toma de datos se inició a los 36 días de haber efectuado la siembra de los explantes, en donde, se tomó datos como el número de brotes producidos por

explante para obtener el porcentaje promedio, así como también el porcentaje de explantes con brotes.

3.4.2.3 Diseño experimental

Se organizaron los tratamientos en un Diseño Completamente Aleatorizado (DCA), con arreglo factorial de 3x2, dos factores en estudio. Los niveles para cada factor en estudio son los siguientes.

Factor A: 6-Benzilaminopurina

Niveles del factor A: **A₁= 3 mg/l**

A₂= 5 mg/l

Factor B: Volumen de medio basal

Niveles del factor B: **B₁= 20 ml**

B₂= 30 ml

B₃= 40 ml

El total de tratamientos en estudio fueron 6 (cuadro 3). Cada tratamiento consto de 9 repeticiones cada uno, siendo la unidad experimental cada frasco con un explante.

3.4.2.4 Variables evaluadas

Se evaluó dos variables durante esta etapa, la actividad se realizó después de cada sub-cultivo (cada 18 días) procediendo posteriormente al re-establecimiento en un medio fresco bajo las mismas condiciones hasta finalizar el siguiente periodo o sub-cultivo. Las variables evaluadas son el porcentaje de brotación y el porcentaje de explantes con brotes.

3.4.2.4.1 Porcentaje de brotación.

Se efectuó el conteo sobre el número de brotes que presento cada explante y se obtuvo el promedio de estos por tratamiento y por sub-cultivo (ciclos), también se hizo un conteo total considerando los dos sub-cultivos evaluados.

Se consideró como brotes a aquellos que se diferenciaron a partir del explante establecido inicialmente.

3.4.2.4.2 Porcentaje de explantes con brotes

Se efectuó el conteo sobre el número de explantes que generaron brotes y se obtuvo el promedio de estos por tratamiento y por sub-cultivo (ciclos), también se hizo un conteo total considerando los dos sub-cultivos evaluados. Se consideró explantes con brotes aquellos que al menos hayan producido un brote en esta etapa.

3.5 Procesamiento y tabulación de datos

Los datos fueron procesados y analizados con la ayuda del software estadístico InfoStat (versión 2008) para la formulación de tablas, así mismo, se utilizó el programa Microsoft Excel 2007 para la elaboración de gráficos y para la toma de imágenes se utilizó una cámara fotográfica marca Sony Cyber-Shot.

3.6 Análisis estadístico de los datos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) al 95% de confianza para determinar las diferencias estadísticas entre los tratamientos, así mismo, se realizó un Test de rangos múltiples de Duncan $\alpha = 0.05$ para comparar las medias de los mismos.

4. RESULTADOS

4.1 Porcentaje de brotación

Se evaluaron dos ciclos de cultivo en la multiplicación del material vegetal, en donde, se midió el potencial de generación de brotes a los 36 días (1^{er} ciclo) y a los 54 días (2^{do} ciclo) de realizada la siembra.

4.1.1 Porcentaje de brotación del Ciclo 1

Tomando como fuente de variación las concentraciones de 6-Benzilaminopurina (Factor A) y el volumen de medio nutritivo (Factor B) en el primer ciclo de cultivo, el análisis de varianza no presento diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos y el porcentaje de brotes por explante obtenidos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis de varianza para porcentaje de brotación *in vitro* de los explantes de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), a los 36 días (ciclo I) después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.

<u>Variable</u>	<u>N</u>	<u>R²</u>	<u>R²</u>	<u>Aj</u>	<u>CV</u>
Numero de brotes	54	0,17	0,08	56,62	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
<u>F.V.</u>	<u>SC</u>	<u>gl</u>	<u>CM</u>	<u>F</u>	<u>p-valor</u>
Modelo.	914,98	5	183,00	1,95	0,1027
FACTOR A	228,17	1	228,17	2,44	0,1251
FACTOR B	225,04	2	112,52	1,20	0,3097
FACTOR A*FACTOR B	461,78	2	230,89	2,47	0,0957
Error	4495,56	48	93,66		
Total	5410,54	53			

En este sub-cultivo se obtuvieron los siguientes porcentajes promedios de brotes; el tratamiento que tuvo mayor porcentaje de brotación en este ciclo fue el T4 (5 mg/l de BAP + 20 ml de MS) con 22.4%, seguido del T2 (3 mg/l de BAP + 30 ml de MS) y T6 (5 mg/l de BAP + 40 ml de MS) que obtuvieron el mismo porcentaje de brotación de 18.3% y el tratamiento con menor porcentaje de brotación fue el T3 (3 mg/l de BAP + 40 ml de MS) con 9.7% de potencial de generación de brotes (Figura 2).

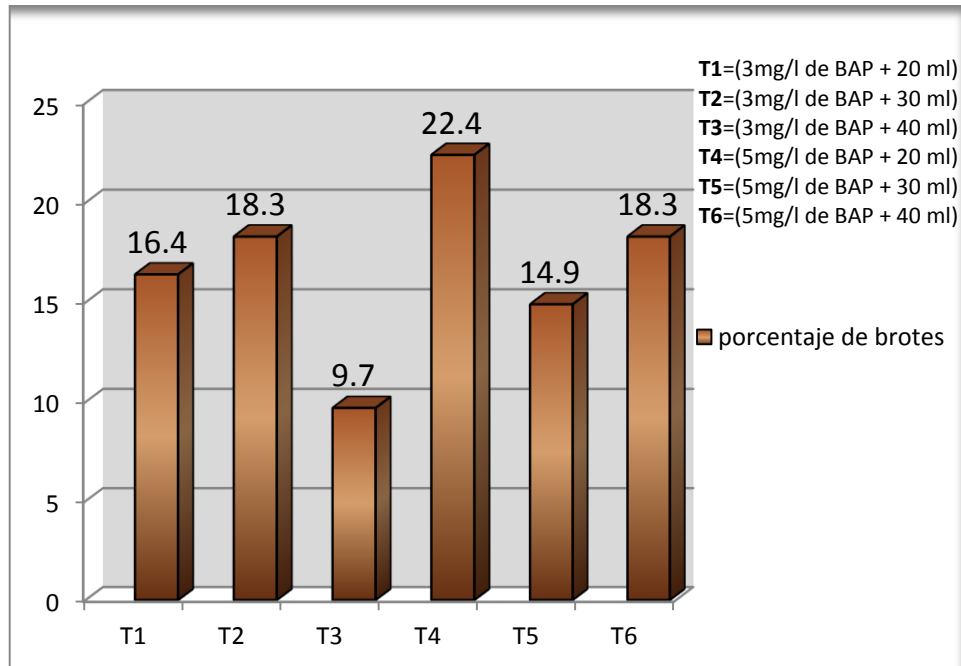


Fig 2. Porcentaje de brotación obtenido en el ciclo 1 en explantes de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.

4.1.2 Porcentaje de brotación del ciclo 2

Al igual que en el ciclo 1 al tomar las fuentes de variación como la concentraciones de 6-Benzilaminopurina (Factor A) y el volumen de medio nutritivo (Factor B), no presento diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos y el porcentaje de brotes por explante al realizar el análisis de varianza (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza para porcentaje de brotación *in vitro* de los explantes de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), a los 54 días (ciclo II) después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Numero de brotes	54	0,11	0,01	38,46

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.	427,04	5	85,41	1,13	0,3586	
FACTOR A	18,96	1	18,96	0,25	0,6191	
FACTOR B	32,26	2	16,13	0,21	0,8089	
FACTOR A*FACTOR B	375,81	2	187,91	2,48	0,0943	
Error	3635,56	48	75,74			
Total	4062,59	53				

La segunda recolección de datos se llevó a cabo a los 54 días de cultivo, en donde, se observó un aumento considerable en la generación de brotes quedando los porcentajes promedios de la manera siguiente el T2 (3 mg/l de BAP + 30 ml de MS) obtuvo el mayor porcentaje de brotes con un 19.6 y el T3 (3 mg/l de BAP + 40 ml de MS) obtuvo el menor porcentaje de brotación con un 13.5%, mientras que los demás tratamientos anduvieron entre este rango de brotación (Figura 3).

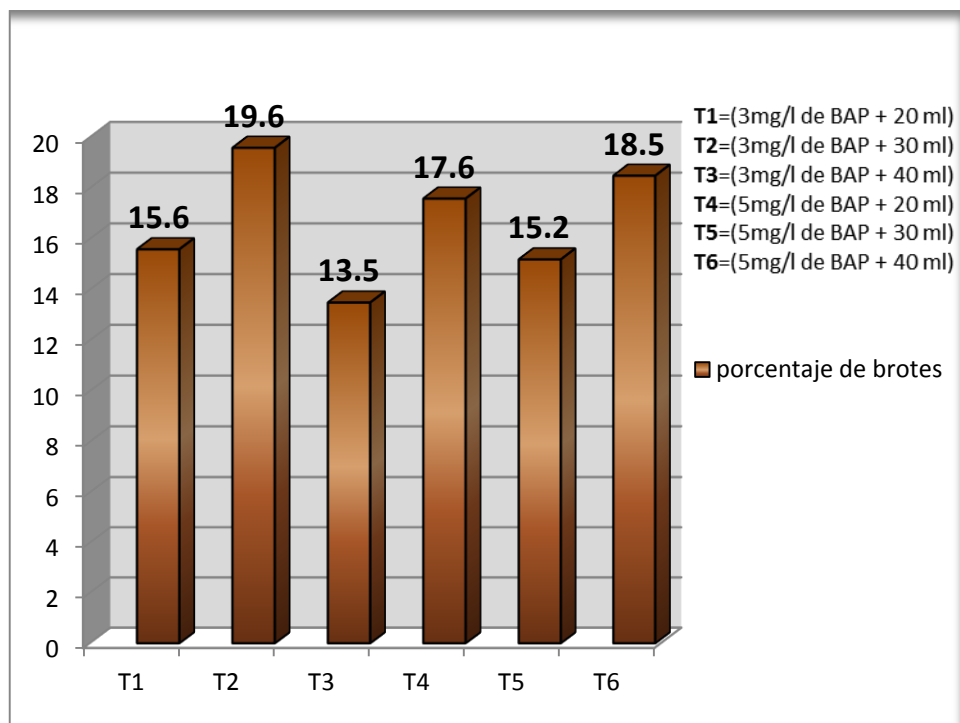


Fig 3. Porcentaje de brotación obtenido en el ciclo 2 en explantes de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.

4.1.3. Porcentaje de brotación para el total de resultados

Tomando como fuente de variación las concentraciones de 6-Benzilaminopurina (Factor A) y el volumen de medio nutritivo (Factor B) en el total de los dos subcultivos, el análisis de varianza no indicó diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos y el porcentaje de brotes por explante obtenidos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza para porcentaje de brotación *in vitro* de los explantes de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), al final de los dos ciclos de multiplicación en la investigación.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Numero de brotes	54	0,14	0,06	44,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2514,59	5	502,92	1,62	0,1720
FACTOR A	303,41	1	303,41	0,98	0,3274
FACTOR B	321,81	2	160,91	0,52	0,5983
FACTOR A*FACTOR B	1889,37	2	944,69	3,05	0,0567
Error	14874,00	48	309,88		
Total	17388,59	53			

El tratamiento que mejor respondió a la etapa de multiplicación con respecto al número de brotes generados por los explantes fue el T4 (5 mg/l de BAP + 20 ml de MS) con un 19.7 % de multiplicación al cabo de 54 días de cultivo, seguido por el tratamiento T2 (3 mg/l BAP+ 30 ml de MS) 19.1% y un 11.8 % de brotación del T3 (3 mg/l BAP + 40 ml de MS), quien obtuvo el menor porcentaje de brotación (Figura 4).

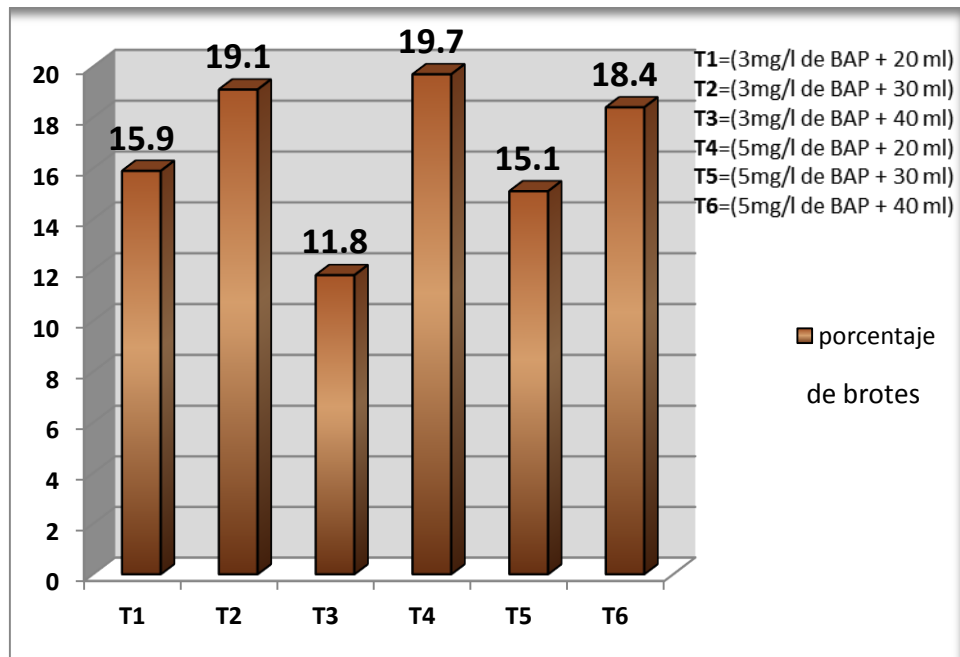


Fig 4. Porcentajes promedios de brotación *in vitro* de explantes de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), a los 54 días de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.

4.2 Porcentaje de explantes con brotes

En este estudio el 100% de los explantes cultivados y observados en los medios nutritivos generaron brotes por lo que no se registraron explantes sin brotes, de tal manera, que se tomaron datos de los mismos días.

4.2.1 Porcentaje de explantes con brotes ciclo 1

Tomando como fuente de variación las concentraciones de 6-Benzilaminopurina (factor A) y el volumen de medio nutritivo (factor B) el análisis de varianza, indico que existe diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos en el porcentaje de explantes con brotes obtenidos en el ciclo 1 (Cuadro 6).

Cuadro 6: Análisis de varianza para porcentaje de explantes con brotes *in vitro* de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), a los 36 días (ciclo 1) después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo,

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Numero de explantes con br..	54	0,15	0,06	36,11	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3,56	5	0,71	1,73	0,1467
FACTOR A	1,85	1	1,85	4,49	0,0392
FACTOR B	0,78	2	0,39	0,94	0,3962
FACTOR A*FACTOR B	0,93	2	0,46	1,12	0,3335
Error	19,78	48	0,41		
Total	23,33	53			

Cuadro 7: Test de Duncan para los niveles de la concentración de 6-benzilaminopurina evaluadas en el ciclo 1 de la multiplicación.

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4120 gl: 48

FACTOR A Medias n E.E.

3 1,59 27 0,12 A

5 1,96 27 0,12 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Cuadro 8: Test de Duncan para los niveles del volumen de medio nutritivo evaluadas en el ciclo 1 de la multiplicación.

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4120 gl: 48

FACTOR B Medias n E.E.

30 1,67 18 0,15 A

40 1,72 18 0,15 A

20 1,94 18 0,15 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Cuadro 9: Interacción entre los niveles de concentración de 6-benzilaminopurina y el volumen de medio nutritivo evaluados en el ciclo 1 de la investigación.

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 0,4120 gl:

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.	
3	40	1,44	9	0,21	A
5	30	1,67	9	0,21	A B
3	20	1,67	9	0,21	A B
3	30	1,67	9	0,21	A B
5	40	2,00	9	0,21	A B
5	20	2,22	9	0,21	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fuente: INFOSTAT (Versión 2008).

Datos de esta variable se colectaron al día 36 de cultivo obteniendo que el tratamiento con mayor porcentaje promedio de explantes con brotes, fue el T4 (5 mg/l de BAP + 20 ml de MS) con 20.8%, un (15.6%) para los tratamientos T1(3 mg/l de BAP + 20 ml de MS), T2 (3 mg/l de BAP + 30 ml de MS) y el T5 (5 mg/l de BAP + 30 ml de MS), obtuvieron el mismo porcentaje de brotación y el T3 (3 mg/l de BAP + 40 ml de MS) que obtuvo el menor porcentaje de brotación con un 13.6% de explantes con brotes (Figura 5).

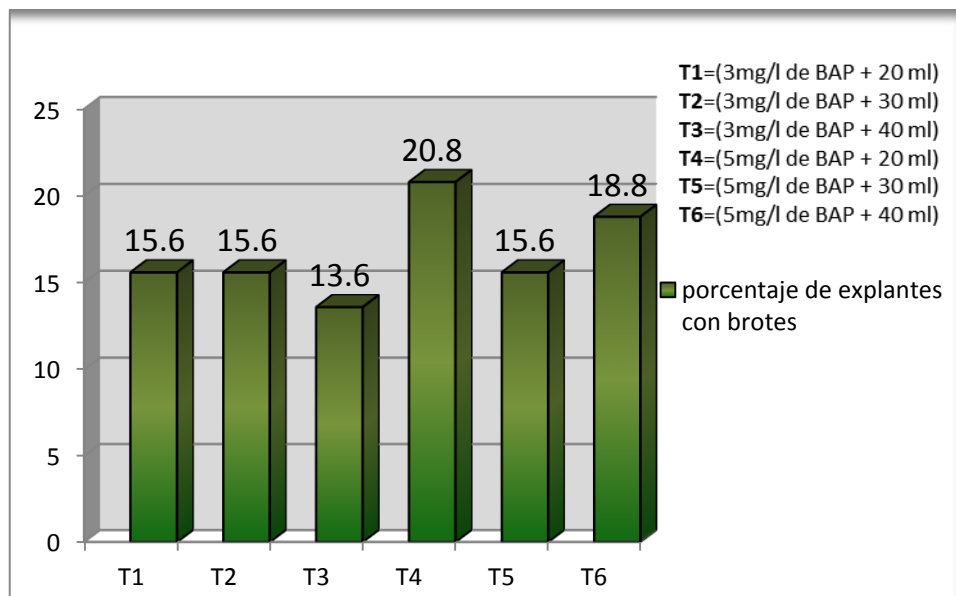


Fig 5. Porcentajes promedios de explantes con brotes en plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), a los 36 días de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.

4.2.2 Porcentaje de explantes con brotes ciclo 2

Tomando como fuente de variación la interacción entre las concentraciones de 6-Benzilaminopurina (Factor A) y el volumen de medio nutritivo (Factor B) el análisis de varianza presento diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos en el porcentaje de explantes con brotes obtenidos en el ciclo 2 (Cuadro 10).

Cuadro 10: Análisis de varianza para porcentaje de explantes con brotes *in vitro* de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), a los 54 días (ciclo 2) después de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Numero de explantes con br..	54	0,20	0,11	33,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15,65	5	3,13	2,36	0,0537
FACTOR A	5,35	1	5,35	4,04	0,0500
FACTOR B	1,15	2	0,57	0,43	0,6507
FACTOR A*FACTOR B	9,15	2	4,57	3,45	0,0397
Error	63,56	48	1,32		
Total	79,20	53			

Cuadro 11: Test de Duncan para los niveles de la concentración de 6-benzilaminopurina evaluadas en el ciclo 2 de la multiplicación.

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 1,3241 gl: 48

FACTOR A Medias n E.E.

3	3,11	27	0,22	A
5	3,74	27	0,22	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 12: Test de Duncan para los niveles del volumen de medio nutritivo evaluadas en el ciclo 2 de la multiplicación.

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 1,3241 gl: 48

FACTOR B Medias n E.E.

30	3,22	18	0,27	A
40	3,50	18	0,27	A
20	3,56	18	0,27	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Cuadro 13: Interacción entre los niveles de concentración de 6-benzilaminopurina y el volumen de medio nutritivo evaluados en el ciclo 2 de la multiplicación.

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 1,3241 gl: 48

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.
3	20	2,78	9	0,38 A
5	30	3,00	9	0,38 A
3	40	3,11	9	0,38 A
3	30	3,44	9	0,38 A B
5	40	3,89	9	0,38 A B
5	20	4,33	9	0,38 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fuente: INFOSTAT (Versión 2008).

En este ciclo se obtuvieron los porcentajes promedios de explantes con brotes, los cuales, presentaron los siguientes resultados el tratamiento que obtuvo mayor porcentaje fue el T4 (5 mg/l de BAP + 20 ml de MS) con un 21.1%, y el menor porcentaje lo obtuvo el T1 (3 mg/l de BAP + 20 ml de MS) con un 13.5% de explantes con brotes, el resto de tratamientos se encontró dentro del rango anterior (Figura 6).

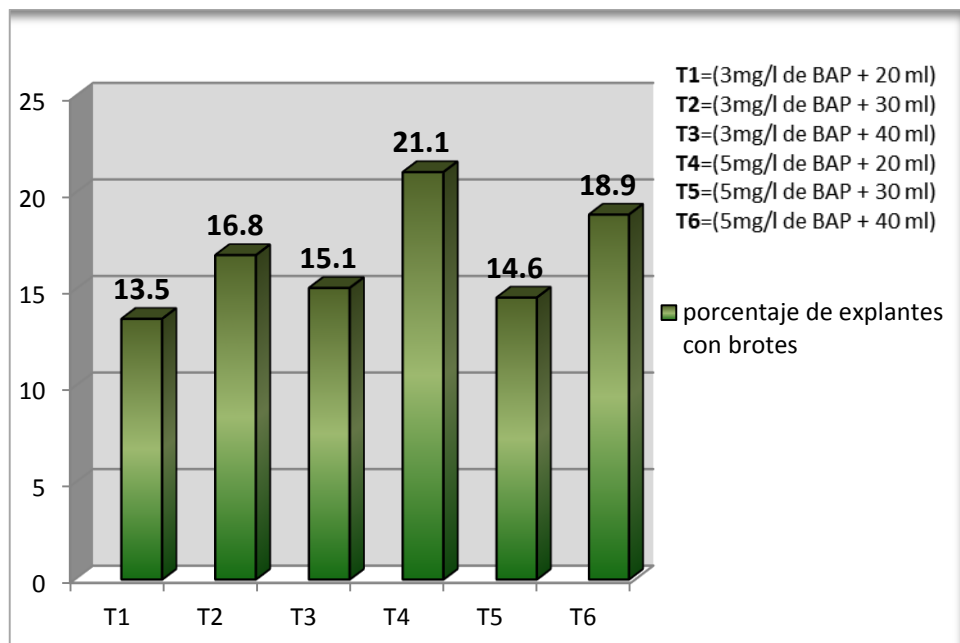


Fig 6. Porcentajes promedios de explantes con brotes en plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), a los 54 días de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo.

4.2.3. Porcentaje de explantes con brotes para el total de resultados

Tomando como fuente de variación las concentraciones de 6-Benzilaminopurina (Factor A) y el volumen de medio nutritivo (Factor B) el análisis de varianza indico que existe diferencia estadística significativa entre las medias de los tratamientos en el porcentaje de explantes con brotes obtenidos (Cuadro 14).

Cuadro 14: Análisis de varianza para porcentaje de explantes con brotes *in vitro* de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), entre ciclo I y ciclo II.

Variable	N	R ²	R ²	Aj	CV
Numero de explantes con br..	54	0,20	0,12	31,68	

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	32,59	5	6,52	2,42	0,0495
FACTOR A	14,52	1	14,52	5,38	0,0247
FACTOR B	4,04	2	2,02	0,75	0,4788
FACTOR A*FACTOR B	14,04	2	7,02	2,60	0,0847
Error	129,56	48	2,70		
Total	162,15	53			

Cuadro 15: Test de Duncan para los niveles de la concentración de 6-benzilaminopurina evaluadas en la investigación.

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 2,6991 gl: 48

FACTOR A Medias n E.E.

3 4,67 27 0,32 A

5 5,70 27 0,32 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Cuadro 16: Test de Duncan para los niveles del volumen de medio nutritivo evaluadas en la investigación.

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 2,6991 gl: 48

FACTOR B Medias n E.E.

30 4,83 18 0,39 A

40 5,22 18 0,39 A

20 5,50 18 0,39 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Cuadro 17: Interacción entre los niveles de concentración de 6-benzilaminopurina y el volumen de medio nutritivo evaluados en esta investigación.

Test: Duncan Alfa=0,05

Error: 2,6991 gl: 48

FACTOR A	FACTOR B	Medias	n	E.E.
3	20	4,44	9	0,55 A
3	40	4,56	9	0,55 A
5	30	4,67	9	0,55 A
3	30	5,00	9	0,55 A B
5	40	5,89	9	0,55 A B
5	20	6,56	9	0,55 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fuente: INFOSTAT (Versión 2008).

El tratamiento que mejor respondió a la fase de multiplicación con respecto a los explantes que generaron brotes fue el T4 (5 mg/l de BAP + 20 ml de MS) con un 21.0% de multiplicación al cabo de 54 días de cultivo, seguido por el tratamientos T6 (5 mg/l BAP + 40 ml de MS) con 18,9%, mientras que el tratamiento que obtuvo el menor porcentaje de brotación fue el T1 (3 mg/l BAP + 20 ml de MS) con un 14.2% (Figura 7).

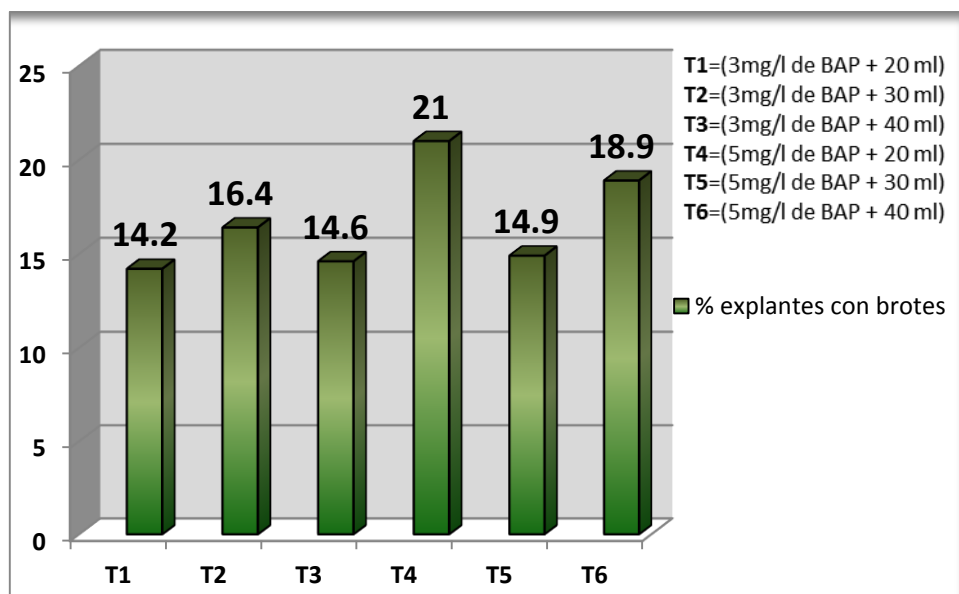


Fig 7. Porcentajes promedios de explantes con brotes de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), a los 54 días de la siembra en medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo, tomando en cuenta los dos ciclos de cultivo.

El ciclo donde se presentó y observo el mayor porcentaje de generación de brotes y porcentaje de explantes con brotes fue el ciclo 2, donde, se obtuvo un 56.6% de brotación y un 65.8% de explantes con brotes, quedando el ciclo 1 con los porcentajes 43.2% de brotación y un 34.2 de explantes con brotes (Figura 8).

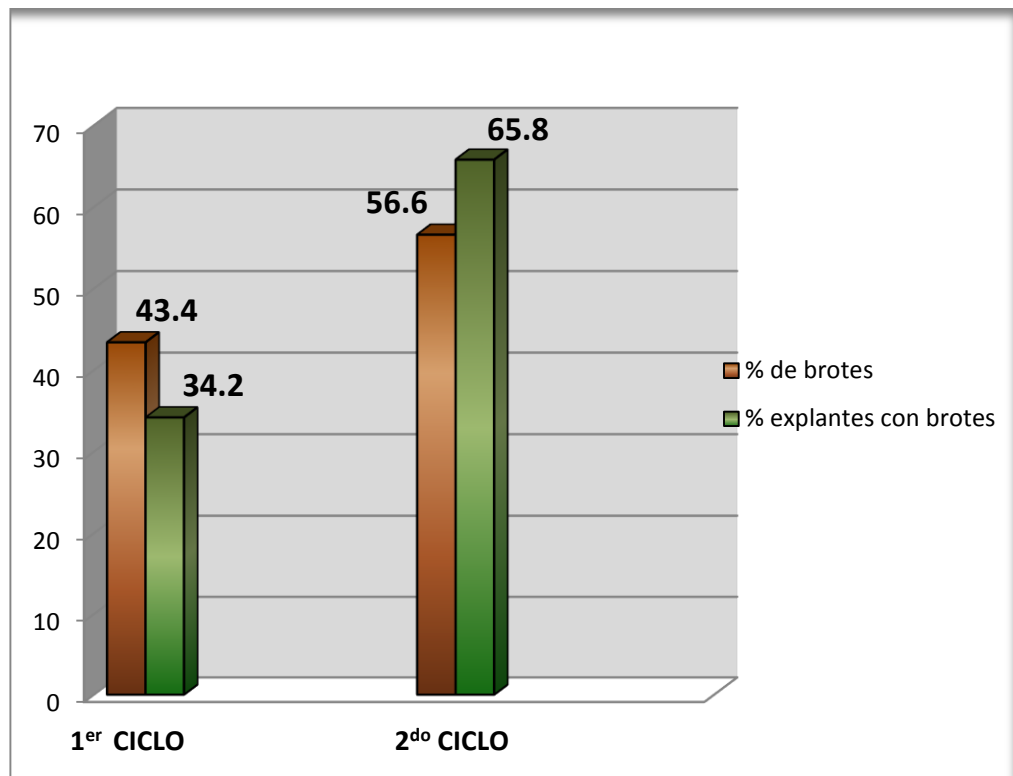


Fig 8. Porcentajes por ciclo de promedios de brotes y explantes con brotes de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-Benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo, tomando en cuenta los dos ciclos de cultivo.

El tratamiento que presento mayor porcentaje de brotación y numero de explantes con brotes fue el T4 (5 mg/l de BAP + 20 ml de MS) con porcentajes de 19.7% y 21.0% respectivamente, seguido por el T2 (3 mg/l de BAP + 30 ml de MS) con un 19.0% de brotación y un 16.4% de explantes con brotes y el tratamiento con menor porcentajes fue el T3 (3 mg/l de BAP + 40 ml de MS) con porcentajes de 11.8% de brotación y 14.6% de explantes con brotes, los demás

tratamientos presentaron su potencial de brotación en el rango de estos porcentajes (Figura 9).

En esta investigación algunas de las unidades experimentales presentaron dominancia apical, pero, esta no fue representativa, los tratamientos en los que se presentó esta característica fueron el (T3 y T5), (Anexo 4).

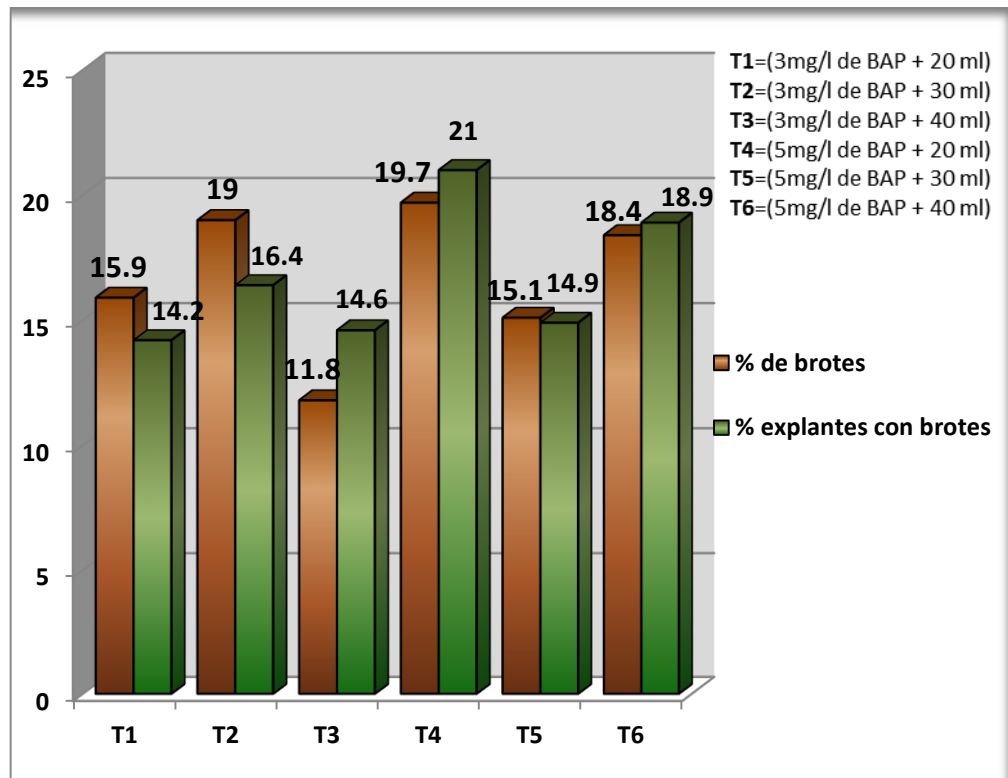


Fig. 9. Porcentajes de tratamientos, en cuanto a promedios de brotes y explantes con brotes de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), en los medios de cultivo suplementados con diferentes concentraciones de 6-benzilaminopurina y volúmenes diferentes de medio nutritivo, al final de la investigación.

5. DISCUSION

5.1 Etapa de multiplicación

5.1.1 Porcentaje de brotes por explantes

Para esta variable se obtuvo una tasa promedio de 19,8 brotes por explante, coincidiendo cercanamente a la máxima tasa de proliferación reportada por Vuylsteke & De Langhe, (1984) y por Banerjee & De Larche, (1985), con promedios entre 16.0 brotes/explante en cultivar de banano (AAA), pero, difiriendo de los datos obtenidos por Arimaitwe *et al.*, (2000), quienes establecieron una tasa promedio de 10.2 brotes por explante en el cultivar “Ndiziwemiti”; 9.5 en el cultivar “Kibuzi” y 8.2 en el cultivar “Bwara” con una dosis de 5 mg/l de 6- Benzilaminopurina en medio líquido en constante agitación. Esta diferencia podría atribuirse a la variabilidad que existe entre una misma especie de organismos, ya que, no existen individuos que posean la misma información genética, esto, como consecuencia influye en las variaciones de las concentraciones hormonales que se encuentran en cada individuo.

El análisis estadístico para el porcentaje del número de brotes por explante muestra que no existe diferencia estadística significativa entre los distintos tratamientos (Cuadros 3, 4 y 5), lo que demuestra que las variaciones de concentración de 6- Benzilaminopurina y el volumen de medio nutritivo empleados no tienen incidencia en la generación de brotes en la etapa de multiplicación.

A pesar de que no se presentó diferencia estadística significativa entre los tratamientos en el ciclo 1, ciclo 2 y total de los resultados, puede observarse que el T4 (5 mg/l de BAP + 20 ml de medio nutritivo) obtuvo mejores resultados en el ciclo 1 (Figura 2) y en la totalidad de los dos ciclos (Figura 4), no así para el ciclo 2 (Figura 3).

Los datos obtenidos demuestran una tendencia en el incremento en el número de brotes por explante al aumentar el número de subcultivos (Figura 8), resultados similares obtuvieron Benerjee & De Langhe, (1985), donde encontraron una ligera tendencia al incremento en el número de hijos por planta en 5 subcultivos consecutivos y 8 cultivares de banano y plátano con el aumento de los subcultivos, este comportamiento puede adjudicarse al efecto positivo de las concentraciones de la fitohormona 6-Benzilaminopurina en promover la división celular de los explantes conforme estos se reestablecieron en un medio nutritivo fresco. Así mismo coincidiendo con Rodríguez *et al.*, (1987) y con Sandoval *et al.*, (1991), quienes obtuvieron un número irregular de hijos por planta en igual número de subcultivos en la micropropagación de dos clones de banano y dos de plátano.

Se obtuvo un promedio de 19.8 brotes/explante a los 54 días de cultivo en medio líquido contrastando con Florio *et al.*, (2010), quien, usando 5 mg/l de 6-Benzilaminopurina en medio sólido obtuvo 1.56 brotes/explantes a los 45 días de cultivo en la etapa de multiplicación, en el plátano, "Harton Gigante" (*Musa AAB*), lo que demuestra la eficiencia de esta técnica al utilizar medios líquidos en la etapa de multiplicación, la alta producción de brotes en medios líquidos es favorecida posiblemente por una mejor absorción de nutrientes, como lo reporta Gupta *et al.*, (1981) quienes encontraron que los medios líquidos facilitan la absorción de nutrientes por la planta debido a la distribución homogénea de los diferentes constituyentes de los medios de cultivo.

5.1.2 Porcentaje de explantes con brotes

Para la variable porcentaje de explantes con brotes se obtuvo el 100% de brotación en los distintos tratamientos, lo que concuerda con lo descrito por Hoyos *et al.*, (2008) que sostiene que para el cultivo de meristemas de plátano las concentraciones comúnmente empleadas en la multiplicación de brotes oscilan entre 2 - 5 mg/l de 6-Benzilaminopurina. Aunque se han utilizado

concentraciones de hasta 10 mg/l del mismo, los cuales, en el clon Zanzíbar (AAB) forman yemas múltiples, los tratamientos que obtuvieron mejores porcentajes de explantes con brotes fueron a los que se les adiciono 5 mg/l de 6- Benzilaminopurina.

Así mismo concentraciones de 3 - 7 mg/l de 6- Benzilaminopurina son consideradas como óptimas para la inducción de brotes sin la formación de raíces en los explantes, siendo los tratamientos (T4), (T6) y (T2) los que alcanzaron los mejores porcentajes de explantes con brotes(Figura 7 y 9), puesto, que el análisis de varianza encontró diferencia estadística significativa entre las variaciones de los factores (Cuadro 6 y 14) los valores encontrados fueron menores al nivel de significancia nominal del test de Duncan (alfa=0.05), para el efecto de 6- Benzilaminopurina (Factor A) comprobando que este factor tuvo efecto estadísticamente directo sobre la generación de explantes con brotes, donde se demostró que no sucede lo mismo para el volumen de medio nutritivo(Factor B), estos son mayores al nivel de significancia elegido de (alfa=0.05).

Los mejores resultados para los ciclos (1^{er} , 2^{do} ciclo y total de datos), se obtuvo en los medios de cultivo suplementados con 5 mg/l de 6- Benzilaminopurina (Figura 7 y 9) lo que concuerda con Hoyos *et al.*, (2008). Quien fundamenta que la fitohormona 6-Benzilaminopurina tiene un efecto directo sobre la generación de brotes, puesto que estas se sintetizan principalmente en las raíces y se transportan desde la raíces al tallo a través de los haces vasculares. Esta fitohormona estimula el desarrollo de los brotes laterales, la multiplicación celular en los meristemos apicales y expansión de las hojas. En la etapa de multiplicación los explantes no presentan raíces, estos, no tienen la capacidad de sintetizar 6- Benzilaminopurina, por lo cual, es fundamental su adición exógena.

Así mismo el análisis estadístico determinó que en el ciclo 1 y total de los dos ciclos la generación de explantes con brotes fue influenciada por la concentración del regulador de crecimiento (Cuadro 7 y 15) y no por el volumen del medio nutritivo empleado (Cuadro 8, 12 y 16).

El análisis comparativo de los datos a través del test de rangos múltiples de Duncan entre las variaciones de los tratamientos, demostró cuál de los factores tuvo incidencia en la generación de explantes que generaron brotes y cuál de las variaciones obtuvo los mejores resultados. (Cuadro 7, 15), también, se demostró que entre las variaciones del factor A, la concentración de 5 mg/l de 6- Benzilaminopurina influyo en la generación de explantes con brotes, no así para el volumen de medio nutritivo.

En el ciclo 1, 2 y total de los resultados (Cuadro 9, 13, y 17) el T4 (5 mg/l de BAP + 20 ml de medio nutritivo), T6 (5 mg/l de BAP + 40 ml de medio nutritivo) y T2 (3 mg/l de BAP + 30 ml de medio nutritivo) se comportarán diferente dentro de la no significancia al resto de los tratamientos para la variable porcentaje de explantes con brotes, este, ultimo tiene un menor costo de producción, por la reducción de 2 mg/l de fitohormona en comparación al T6, mientras, que requiere de mayor volumen de medio, mientras que para la proliferación masiva de brotes en los explantes se utilizan concentraciones intermedias de 6- Benzilaminopurina, siendo el T4 (5 mg/l de BAP + 20 ml de medio nutritivo) el más idóneo para la implementación en esta etapa dentro de la técnica, ya que, se reducen 20 ml de medio nutritivo.

La concentración de 6-Benzilaminopurina al interactuar con el volumen de medio nutritivo tuvo efecto conjuntamente (dependiente uno del otro) en la generación de explantes con brotes. Hecho que según Menjerres & Perea (2012), son las concentraciones intermedias de 6-Benzilaminopurina las más adecuadas para el crecimiento y vigorosidad de las plántulas, porque a

concentraciones relativamente altas de citoquininas reduce la dominancia apical que se presentó en algunas unidades experimentales (Anexo 4).

Al comparar las variables evaluadas (Figura 9), se demostró que la generación de explantes con brotes está ligada fuertemente al número de brotes que generaron los explantes, dado que, el número de explantes que respondieron a la brotación fue dependiente de los brotes de los que se originaron en un determinado explante, de tal manera, que la variable que dio la pauta para la obtención de resultados satisfactorios en la instigación es la variable número de brotes por explante.

6. CONCLUSIONES

El material vegetativo de plátano *Musa paradisiaca* (var. *curare enano*), brinda mejores resultados al tratarlos con 5 mg/l de 6-Benzilaminopurina en la etapa de multiplicación.

Al analizar los resultados del porcentaje de número de brotes por explante y el porcentaje de explantes con brotes, el Tratamiento (4) (5 mg/l de 6-Benzilaminopurina + 20 ml de volumen de medio nutritivo), fue el que presentó los mejores resultados.

Las variaciones de concentración de 6- Benzilaminopurina influyeron directamente en el porcentaje de explantes con brotes, obteniéndose porcentajes mayores en los tratamientos a los que se les adicionó 5 mg/l.

Las variaciones de volúmenes de medio nutritivo no incidieron en el porcentaje de explantes con brotes.

Las variaciones de concentración de 6- Benzilaminopurina y diferentes volúmenes de medio nutritivo no influyeron en el porcentaje de brotes por explante.

La utilización del medio en consistencia líquida en la etapa de multiplicación, reduce los costos de producción por la exclusión del agente gelificante.

7. RECOMENDACIONES

Utilizar 5 mg/l de 6- Benzilaminopurina + 20 ml de medio nutritivo para multiplicar masivamente material vegetativo de plátano *Musa paradisiaca* (*var. curare enano*), en la etapa de multiplicación, en medios de consistencia liquida.

Utilizar 5 mg/l de 6-Benzilaminopurina en combinación con los diferentes volúmenes alternativos de 20 ml, 30 ml y 40 ml de medio nutritivo para obtener mejores resultados en el porcentaje de número de brotes por explantes y el porcentaje de explantes con brotes en la etapa de multiplicación de *Musa paradisiaca* (*var. curare enano*),

Evaluar volúmenes inferiores a 20 ml, para reducir los costos, puesto, que todas las variaciones de volúmenes mostró similitudes numéricas, dentro de la no significancia para los explantes que generaron brotes en la etapa de multiplicación.

Utilizar variaciones de concentración intermedias de 6-Benzilaminopurina de 3 a 5 mg/l adicionada a medios de consistencia liquida, puesto, que en altas dosis en los medios genera variabilidad o mutación en el fenotipo del material propagado.

Realizar tratamientos con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en medio líquido para determinar el tipo de interacción entre sus factores y respectivos niveles, en cuanto, a la generación de brotes de plátano *Musa paradisiaca* (*var. curare enano*), en la etapa de multiplicación.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abdelnour, A.; Vicente, Escalante, J. 1994. Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica. Pc. 38.
2. Arinaitwe, G.; P. Rubaihayo y M. Magambo. 2000. Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa spp.*) cultivars. *Scientia Horticulturae* (NLD) 86: 13 – 21.
3. Azofeifa A, 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro* (versión electrónica), *Agronomía Mesoamericana*. Pc. 21
4. Banerjee, N. & De Langhe, E. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (Banan and Plantains). Minnesota, U.S.A. En *Plant Cell Reports*. Pp 12.
5. Basail, P, M. Vega, V. Eneida Gálvez, E. Torres, M. Cabrera, M. López, J. Santos, A. Rayas, A. Bauta, M. Páz, E. Beovidez, Y. (2012). Empleo de Sistemas de Inmersión Temporal como alternativa para la multiplicación *in vitro* del cultivar de plátano vianda 'INIVITPV06-30' (*Musa spp.*, AAB) *Bioteología Vegetal Vol. 12, No. 1: 53 – 57*.
6. Berthouly, M. 1989. Informe final del proyecto desarrollo y reproducción de variedades con resistencia a la roya del café: Cultivo de tejidos, San José, Costa Rica Pc. 90
7. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) 1987, II curso de cultivo de tejidos, Turrialba, Costa Rica
8. Coto, G. 2007. Conceptos introductorios a la fitopatología, primera edición, San José, Costa Rica. Pc. 295

9. Dublin, P.1993. Multiplicación vegetativa de Café, Avena y Cacao. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali. Colombia. Pc. 578-595
10. FHIA. (1985) Manual de plátano. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. LLuna Cortes, Honduras 131p.
11. Flores, A. 2001. Establecimiento de las etapas iniciales de la micropropagación de caoba (*Swietenia macrophylla King*) a partir de microestacas, tomadas de plantas de invernadero, Torrialba, Costa Rica, Tesis de Posgrados en ciencias agrícolas y Recursos naturales, CATIE.
12. Florio, S.; Real, L.; & Mogollón, N. 2010. Regeneración in vitro del plátano cv. 'hartón gigante' (*Musa aab*), Boletín del centro de investigaciones biológicas, Volumen 44, No, 4, Maracaibo, Venezuela, pc 425-440
13. Guerra, G. D.A (1998) Manejo del cultivo de Banano en la costa norte del país. Diagnostico-EPISA. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. Pags 89.
14. Gupta, P. K.; Mascarenhas, A. F. & V. Jannathan. 1981. Tissue culture of trees: clonal propagation of mature trees of *Eucalyptus citriodora Hook*, by tissue culture. Planta science letters. Limerick. 20: 195-201.
15. Grajeda, D. 2001. El plátano: información técnica del plátano. Guatemala, Editorial. 38 p.
16. Hernández, R.; C. Collado & P. Lucio, 2010. Metodología de la investigación, quinta edición, México, McGraw-Hill, Interamericana editores S.A de S.V, 607 p

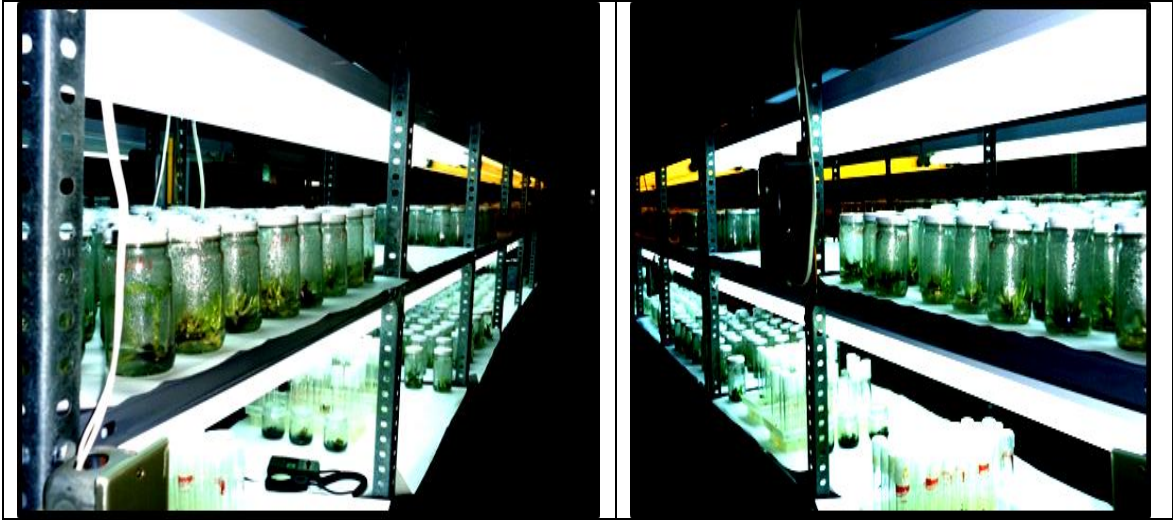
17. Hoyos, J. L.; C, Perea & Velasco, R. 2008. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormona en la micropropagación del plátano dominico Harton (*Musa AAB Simmonds*). Facultad de ciencias Agronómicas del Cauca, volumen 6, N^a 2, págs. 109
18. IICA. 2008 (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura) Estudio de la Cadena agroindustrial del plátano en República Dominicana: IICA. Pc 77
19. Izco, J. Barrero, E. Bruges, M. Costa, M. Devesa, J. Fernández, F. Gallardo, T. Llimona, X. Prada, C. Talavera, S. Valdés, B. 2004 Botánica. (2^a Edición). Colombia, Bogotá: MC-GRAW HILL INTERAMERICANA. Págs 906.
20. Landaverde, V.; López A; Vásquez, T. 2002. Estudio de Inducción a Callo embriogénico en variedades comerciales de Café (*Coffea arabica*) de El Salvador. Tesis Ing. Agr. San Salvador, SV. Universidad de El Salvador. Pc. 97
21. López, M. 2013. Establecimiento de un protocolo para el inicio del cultivo in vitro de *Agave letonae* (HENEQUÉN) a partir de yemas axilares, tesis de licenciatura en biología. Universidad de El Salvador.
22. Menjerres, E. H. & Perea M. 2012. Establecimiento de un protocolo de propagación de Gulupa (*Passiflora edulis* sims.) a partir de embriones cigóticos y yemas axilares, agron. 20(2): 53 – 64
23. Murashige T. & F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth on bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473 – 497.

24. Quintanilla, K. 2003. Micropropagación in vitro de loroco (*Fernaldia pandurata woodson*) a partir de meristemas apicales del brote, san salvador, tesis de licenciatura en biología, Universidad de El Salvador.
25. Roca, W. & Mroginski, L. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Colombia. Pc. 20-35.
26. Rodríguez, M.; Lorenzo, J. & García, A. 1987. Significance of the physiological history of the explant in the vegetative of banana shoot tips. Acta Horticulturae 212. Pp 61-68.
27. Sandoval, F. J, A. 1991. Micropropagación de plátano y banano (*Musa AAB, AAA*) en el CATIE. Turrialba (CR): Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 29 p. Serie técnica. Informe técnico / CATIE, no. 186.
28. Solórzano, M, A. 2012. Impacto sobre el rendimiento del cultivo de plátano (*Musa paradisiaca L.*) producto de la introducción de la variedad curare enano Dominico Harton (AAB, Chifle) en parcelamiento La Blanca, Ocos, San Marcos, Coatepeque. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Rafael Landívar.
29. Usui, K.; K, Okabe, Victores. Pernillo, A.; E, Ramírez. 1996. Principios Básicos de Tejidos Vegetales, Guatemala, 166 pag.
30. Villalobos, A. Thorpe. A, 1991. Micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. CIAT, Colombia. Pc. 128-131.
31. Vuylsteke, D. & De Langhe, E. 1984. Feasibility of in vitro propagation of bananas and plantains, Tropical Agriculture. Trinidad. Vol. 62. N° 4. Pp. 323-328.

32. Zomlefer, W, B. 1994. Guia de familias de las plantas con flores. Zaragoza, España: ACRIBIA, S.A. 441 pág.

ANEXOS

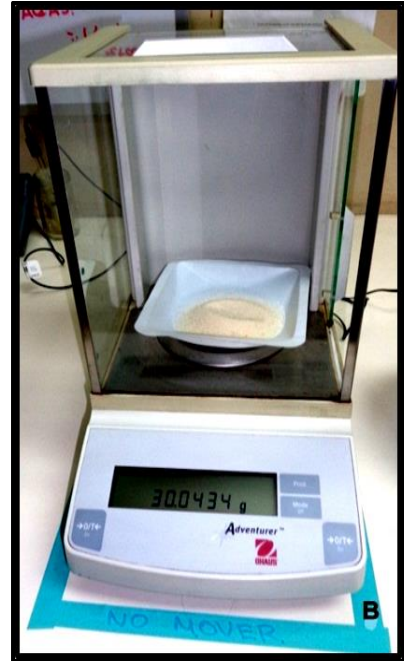
Anexo 1. Material vegetal aportado por (GENSA) Genética Salvadoreña S.A de C.V. en cámara de crecimiento (CENTA).



Anexo 2 Preparación de medios de cultivo.



2-A Adición de 10ml de c/u de las soluciones madres.



2-B Pesaje de sacarosa



2-C Ajuste de pH a 5.8



2-D Autoclaveado de medio

Anexo 3. Agitador implementado en la investigación para garantizar la homogenización del medio nutritivo y prevenir la fenolización.



Anexo 4. Dominancia apical presentada por unidades experimentales de los tratamientos (T3 y T5)

