



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
ESCUELA DE AGRONOMÍA



PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO
AGRONÓMO**

TEMA:

**“EFECTO DE DIFERENTES COMBINACIONES DE REGULADORES
DE CRECIMIENTO EN PLÁTANO (*Musa AAB*) cv. BARRAGANETE Y
CURARÉ MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS”**

AUTORA:

Marbelin Arisbel Del Valle Moreira

TUTORA:

Ing. Liliana Corozo Quiñonez

SANTA ANA- MANABÍ- ECUADOR

2016

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
ESCUELA DE AGRONOMIA

Tema: “EFECTO DE DIFERENTES COMBINACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN PLÁTANO (*Musa AAB*) cv. BARRAGANETE Y CURARÉ MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS”

TESIS DE GRADO

Sometida a consideración del Tribunal de Seguimiento y Evaluación, legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

APROBADA POR:

CERTIFICACIÓN

Ing. Mg.Sc. **LILIANA COROZO QUIÑONEZ**, Docente de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, certifica:

Que la tesis de grado titulada “**EFEECTO DE DIFERENTES COMBINACIONES DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN PLÁTANO (*Musa* AAB) cv. BARRAGANETE Y CURARÉ MEDIANTE CULTIVO *IN VITRO* DE TEJIDOS**”, es trabajo original realizado por la egresada **MARBELIN ARISBEL DEL VALLE MOREIRA**, que fue realizado bajo mi dirección.

ING. LILIANA COROZO QUIÑONEZ
TUTORA DE TESIS

AUTORÍA

La responsabilidad de las ideas, resultados y conclusiones de la presente investigación, corresponde únicamente al autor.

Marbelin arisbel Del Valle Moreira

AGRADECIMIENTO

Deseo agradecer en primer lugar a los amores de vida, mis pilares emocionales, la luz de mis ojos, mis adorados padres *Magali Moreira* y *Kleber Del Valle* y mis locos hermanos *Jarys* y *Katherine*, por apoyarme en las adversidades que se presentaron en el camino, ellos quienes con sabias palabras me permitieron seguir para no decaer sin importar los obstáculos por duros que parecían y con ello seguir avanzando en todo este proceso.

A mi compañero, amigo, cómplice *Robert Mejía*, por ser una persona que tiene la sutileza de sacarme una sonrisa, por brindarme su apoyo incondicional y emocional, gracias por su comprensión y saber que estuvo a mi lado en todo momento.

Un profundo agradecimiento a la *Ing. Liliana Corozo Quiñonez* quien depositó su confianza y conocimiento en mí para hacer posible esta investigación, brindándome siempre una mano amiga.

Sin dejar de agradecer a la *Ing. Fátima Macías*, por toda su enseñanza técnica y compromiso para que se haga posible esta investigación, además a mi compañero y amigo *Merlín Suaréz*, que desde inicio de este proceso (largas horas en el laboratorio) fue un importante apoyo en todo el proceso universitario y especialmente de esta investigación.

Por último pero no menos importante un espontaneo agradecimiento a las autoridades de la Universidad Técnica de Manabí, especialmente a la Facultad de Ingeniería Agronómica, por acogerme en su Alma Mater durante los años de estudio, mediante los conocimientos oportunos de los profesores.

A todos y cada uno de ustedes, GRACIAS!!

DEDICATORIA

“Este esfuerzo, compromiso, dedicación y trabajo se lo dedico con amor infinito a mis padres *Magali Moreira y Kleber Del Valle*, quienes con su sabiduría y dedicación han sido el pilar principal en mi vida y por siempre serán esa gran luz que guíe mi camino en los obstáculos que se presenten al andar. Los amo más allá de lo expresado en estas palabras”

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí en el año 2016. EL propósito de la investigación fue evaluar la respuesta de la combinación de bencilaminopurina y ácido indolacético en la propagación *in vitro* de dos cultivares de plátano *Musa* AAB: Barraganete y Curaré, clones de interés comercial en Ecuador. Para el ensayo la micropropagación se realizó en dos fases: establecimiento utilizando medio Murashige y Skoog (MS), luego la fase de multiplicación de brotes un medio MS suplementado con reguladores de crecimiento. Todos los medios fueron suplementados con vitaminas, ácido ascórbico, ajustando el pH a 5.8, en condiciones de una humedad de 70%, temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo 16/8 de oscuridad. Los resultados en la fase de establecimiento muestran una baja contaminación en ambos cultivares en estudio con la metodología utilizada, por su parte el cv. Barraganete mostró un crecimiento y desarrollo tardío al iniciar a manifestar cambios visibles en los explantes a diferencia del cv. Curaré con aproximadamente 9 días de diferencia. Durante la fase de multiplicación *in vitro*, la mejores respuestas en número promedio de brotes/explante se obtuvo que el mejor tratamiento fue T1 (3 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ AIA) para ambos materiales, sin embargo en el cv. Curaré fue T2 (4mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ AIA) mientras para el cv. Barraganete fue T2 (4 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ AIA)

Palabras claves: micropropagación, cultivo *in vitro*, plátano cvs.. Barraganete y Curaré, explantes, meristemos

SUMMARY

The present research work was carried out in the laboratory of biotechnology at the Faculty of agricultural engineering of the Technical University of Manabí in 2016. The purpose of the research was to evaluate the response of the combination of benzylaminopurine and indoleacetic acid in vitro propagation of two cultivars of banana Musa AAB: Barraganete and Curaré, clones of commercial interest in Ecuador. To test micropropagation took place in two phases: establishment using medium of Murashige and Skoog (MS), then the phase of multiplication of outbreaks a MS medium supplemented with plant growth regulators. All media were supplemented with vitamins, ascorbic acid, adjusting pH to 5.8, under a humidity of 70%, temperature of 25 ± 2 °C and a 16/8 dark photoperiod. The results in the phase of establishment show a low pollution in both cultivars in the methodology used study, however the cv. Barraganete showed growth and late development when you start to manifest visible changes in the explants in contrast to the cv. Curaré with approximately 9 days apart. During the phase of in vitro multiplication, the best responses in average number of outbreaks/explant was obtained that the best treatment was T1 (3 mg L⁻¹ BAP 0.1 mg L⁻¹ AIA) for both materials, however in the cv. Curaré was T2 (4 mg L⁻¹ BAP 0.1 mg L⁻¹ AIA) while for the cv. Barraganete was T2 (4 mg L⁻¹ BAP 0.1 mg L⁻¹ AIA).

Key words: *in vitro*, culture, Micropropagation, banana cvs. Barraganete and Curaré, explants, meristems.

INDICE GENERAL

CONTENIDO	PAG.
1. INTRODUCCIÓN	- 1 -
2. PROBLEMÁTICA	3
3. ANTECEDENTES	6
4. JUSTIFICACIÓN	8
5. OBJETIVOS	10
6. MARCO REFERENCIAL.....	11
6.1. Descripción taxonómica	11
6.2. Origen y distribución	12
6.3. Importancia económica y nutricional	12
6.4. Descripción morfológica	13
6.5. Cultivares de importancia comercial	14
6.5.1. Cultivar Barraganete	14
6.5.2. Cultivar Dominico	15
6.5.3. Cultivar Dominico Hartón	15
6.5.4. Cultivar maqueño	15
6.5.5. Cultivar Curaré.....	16
6.6. Métodos de propagación	16
6.6.1. Método de propagación tradicional	16
6.6.2. Método de propagación vegetal <i>in vitro</i>	17
6.7. Importancia de la propagación <i>in vitro</i> de plátano.....	19
6.8. Etapas o fases del cultivo <i>in vitro</i>	20
6.8.1. Selección del material vegetal	20
6.8.2. Desinfección del material vegetal.....	20
6.8.3. Establecimiento aséptico del cultivo	21
6.8.4. Multiplicación	21
6.8.5. Enraizamiento.....	21
6.8.6. Aclimatación en campo	22
6.9. Medios de cultivo	22
6.10. Desinfectantes	24
6.11. Condiciones ambientales del cultivo	25
7. DISEÑO METODOLOGICO	26

7.1.	Localización del ensayo	26
7.2.	Material vegetal	26
7.3.	Medio de cultivo.....	27
7.4.	Condiciones de cultivo.....	27
7.5.	Metodología	27
7.5.1.	Factores en estudio	27
7.5.2.	Tratamientos	28
7.5.3.	Diseño experimental.....	28
7.5.4.	Análisis Estadístico.....	29
7.6.	Manejo del ensayo	29
7.6.1.	Establecimiento de ápices de plátano cultivares Barraganete y Curaré en laboratorio	29
7.6.2.	Determinación de la mejor concentración de citoquininas y auxinas para el desarrollo de los brotes <i>in vitro</i>	31
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1.	Porcentaje de contaminación.....	34
8.2.	Tiempo de respuesta	38
8.3.	Longitud de brotes	39
8.4.	Diámetro de los brotes	40
8.5.	Número promedio de brotes/explante	41
9.	CONCLUSIONES	44
10.	RECOMENDACIONES	45
11.	BIBLIOGRAFÍA	46
12.	ANEXOS	60

1. INTRODUCCIÓN

En general se conoce que los bananos y plátanos son nativos del sudeste asiático y proceden de dos especies silvestres, *M. balbisiana* Colla y *Musa acuminata* Colla. Por su parte, las musáceas pertenecen a la clase liliopsida, al orden Zingiberales y a la familia Musaceae (Medina *et al.* 2015, 48).

El género *Musa spp.*, es un producto de alto consumo en muchos países en vías de desarrollo. Cada una de las principales regiones productoras (América Latina y el Caribe, Asia - Pacífico y África) aporta cerca de un tercio de la producción mundial.

El plátano (*Musa AAB*) es uno de los productos agrícolas que más aporta calorías, por lo que se ha convertido en uno de los alimentos indispensable de la dieta alimentaria, esencialmente para la población de bajo recurso de los países tropicales (Torres *et al.* 2015, 563).

De la misma manera, este cultivo interviene en el patrimonio de las familias aportando ingresos económicos que proceden de actividades plataneras y bananeras, además de la generación de divisas en los países productores (Rodríguez y Guerrero, 2002).

Por lo mencionado radica la importancia y preferencia en el mejoramiento de los cultivos, los cuales han servido de base a nivel mundial en actividades significativas, para los recursos fitogenéticos a nivel mundial (Navarrete *et al.* 2013, 6).

Los principales países productores de plátano la encabezan Uganda, Ghana, Camerún, Ruanda, Colombia y Nigeria, produciendo en el 2011 aproximadamente 38.9 millones de toneladas (FAOSTAT, 2011).

En el 2010, América Latina y el Caribe suministraron el 63.7% del comercio internacional de plátano, que incluye principalmente la producción de Ecuador (33.2%), Colombia (10.2%), Costa Rica (10%) y Guatemala (8.6%). Los cinco países que lideran la exportación (Ecuador, Colombia, Filipinas,

Guatemala y Costa Rica) proporcionan el 73.6% del comercio mundial; el resto de países productores del mundo aportan el 26.4% de la producción exportable (Álvarez *et al.* 2013).

En relación a la producción que logran otros países como Colombia y Costa Rica, el MAGAP (2015, 3), reporta que los rendimientos actuales del Ecuador son limitadamente bajos con 5 t/ha comparándolos con 10 y 12 t/ha de estos países, respectivamente.

La baja productividad registrada en Ecuador está asociada a la presencia de problemas bióticos (*Sigatoka spp*, Nematodos, Picudo negro, Virosis, etc.), abióticos (sequía principalmente) y al insuficiente uso de métodos tecnológicos en el campo (riego, fertilización, control fitosanitario, entre otros). Esto se proyecta al revisar las estadísticas nacionales INEC (2012), las cuales reportan que del total del área cultivada, el 14% reciben riego, 35% fertilización y el 34% control fitosanitario, lo que demuestra que alrededor del 86% del plátano está en condiciones de secano, además el 65% no recibe ningún manejo agronómico y tecnológico, provocando bajos rendimientos alcanzados.

Este cultivo ha incrementado su valor social y económico, haciendo necesario mejorar el rendimiento de producción y calidad del producto, mediante la introducción de tecnologías de reproducción eficiente que permitan aumentar la producción. Por lo que, muchos países han buscado alternativas tecnológicas, como el caso de cultivo *in vitro* de tejidos el cual facilita una propagación más rápida y en mayores volúmenes; se da el intercambio de germoplasma sin riesgos de diseminar plagas y enfermedades por lo cual se obtienen plantas sanas ayudando a incrementar los rendimientos (Medina *et al.* 2015, 48).

2. PROBLEMÁTICA

Los recursos fitogenéticos, representan un medio esencial para la producción agrícola constituyendo la base biológica para salvaguardar la seguridad alimentaria mundial. Estos recursos son la materia prima más importante para la generación de nuevas variedades y el mayor aporte para la producción y la diversidad genética que emplean los agricultores. También conforman un banco de adaptabilidad y estabilidad genética que sirve de una garantía ante el peligro potencial representado por las alteraciones medioambientales y económicas, los agentes patogénicos, plagas insectiles y/o otras nuevas plagas o sus biotipos (FAO 2014, 7).

El agro ecuatoriano manobra como un importante motor del progreso del país, produciendo suministro de subsistencia, bienes y servicios para el mercado local y mundial, sobre la base de procesos de concertación público-privada, entre organizaciones gremiales fortalecidas e instituciones eficientes que ayudan a mejorar la calidad de vida de la población y las comunidades rurales (INIAP 2008, 12). Alimentos

Es un hecho reconocido que el hombre ha usado a las Musáceas comestibles como alimento por miles de años contribuyendo a las dietas básicas de numerosos pueblos en los trópicos y subtrópicos, siendo una de las primeras frutas que cultivaron los agricultores primitivos (Román 2012, 10). De esta manera, el plátano (*Musa* spp.), forma parte sustancial de la alimentación diaria para 400 millones de individuos aproximadamente, en más de 100 países del trópico y subtrópico. Por la importancia de este cultivo, existe la necesidad de optimizar la productividad y la calidad mediante nuevas tecnologías (Uzcátegui *et al.* 2010, 7).

Según Paz y Pesantes (2013, 206-7), el plátano en Ecuador, representa un rubro de exportación trascendente, generando fuentes de empleo en muchas zonas del país, por lo cual, es considerado parte sustancial de la dieta diaria de las familias ecuatorianas. Siendo el triángulo platanero, la mayor zona de producción, la cual abarca las provincias de Manabí, Santo Domingo de los Tsáchilas y los Ríos. Las

mismas que según Pro Ecuador (2015, 6), cuentan con una superficie plantada de 50376, 18981 y 10313 ha, respectivamente.

Según Paz y Pesante (2013, 207), las principales variedades explotadas en estas zonas son el “Dominico”, que se lo destina esencialmente para el auto-consumo y el cultivar “Barraganete” que gran parte de su producción se destina a la exportación. Sin embargo, los problemas que enfrenta el sector platanero a nivel mundial y nacional son el bajo rendimiento que presentan los diferentes materiales distribuidos en las zonas productoras.

El plátano, tradicionalmente se propaga de forma asexual utilizando los cormos o hijuelos. Este sistema de propagación convencional, permite la diseminación de plagas y enfermedades a nuevas áreas de cultivos, donde los problemas fitosanitarios más frecuentes se dan por la presencia de nematodos, picudo negro y pulgones harinosos, por lo que se requiere la aplicación de otro método de propagación, que permita obtener de manera masiva plántulas sanas y de excelente calidad. En la actualidad, la mayoría de los productores que todavía usan hijuelos como material de propagación, prefieren utilizar hijos de espada de mayor tamaño con rizomas grandes que permiten alcanzar altos porcentajes de establecimiento en campo bajo condiciones de alta humedad (Robinson y Galán 2010, 138).

Según Robinson y Galán (2012, 137), en las últimas tres décadas en el mundo, se ha reducido rápidamente la utilización de hijuelos de plátano, como material de propagación. Su importancia comercial está por desaparecer en países productores como Israel, Taiwán, Sudáfrica y las Islas Canarias. Es más habitual encontrar plantaciones con el uso de hijuelos en países subdesarrollados (Ecuador, Venezuela, Colombia, República Dominicana, entre otros) donde sus agricultores no se acostumbran al uso de nuevos métodos de propagación, lo que predispone a la plantación a presentar problemas sanitarios.

De lo expuesto anteriormente, se deduce la importancia de adoptar otras formas para obtener semillas de origen asexual, tales como la propagación masiva

de plantas *in vitro*, basada en el cultivo de tejidos, asegurando la disponibilidad continua de los recursos fitogenéticos para la investigación, la reproducción y la mejora del abastecimiento de semillas para un sistema agrícola sostenible y resiliente.

3. ANTECEDENTES

Haberlandt, en 1902, citado por Forero (2011, 18), realizó los primeros intentos del cultivo de células vegetales aisladas, utilizando un medio artificial, siendo el que pionero al utilizar el término de totipotencia celular.

En otro estudio Kotte y Robbins en 1922, citado por Forero (2011, 18), postularon que un cultivo *in vitro* de tejidos vegetales podría tener éxito si se inicia a partir de células meristemáticas como las presentes en las puntas de las raíces o en las yemas de los vegetales.

Por su parte Went en 1926, citado por Jordán y Casaretto (2006, 2), demostró que la influencia transmitida desde el ápice hacia la parte inferior del hipocotilo, favorece la inclinación de este hacia la luz, debido a un efecto de naturaleza química que denominó auxinas. De la misma manera Thimann en 1937, citado por Jordán y Casaretto (2006, 3), identificó, aisló y denominó dicho compuesto como ácido indolacético (AIA), primer regulador de crecimiento natural aislado.

Años después Robbins en 1936, citado por Forero (2011, 18), al estudiar el efecto de algunos microelementos en cultivos de tejidos, encontró que los microelementos Zn, Mn y B son importantes para el desarrollo *in vitro* de los puntos de crecimientos de las raíces.

De la misma manera, Blakeslee *et al.* (1941), citado por Ramírez *et al.* (2012,19), encontraron que el agua de coco (AC) tiene propiedades estimulantes para el desarrollo de embriones de híbridos de *Datura stramonium*.

Posteriormente Ball en 1946, citado por Ramírez *et al.* (2012, 19), demostró la posibilidad de regenerar plantas *in vitro* morfogénicamente completas a partir de meristemos apicales. Así mismo, Caplin y Steward (1948) citado por Forero (2011, 19), encontraron un incremento significativo en la tasa de proliferación de callos a partir de ápices de raíces de zanahoria, cuando se le adicionaba agua de coco al

medio. Cabe indicar que Morel y Wetmore (1955) citado por Ramírez *et al.* (2012, 20), lograron por primera vez cultivar *in vitro* especies monocotiledóneas, las cuales habían mostrado dificultades para este tipo de cultivos.

En el caso particular de *Musa spp.*, se han realizado varios ensayos, entre los que se destacan el ensayo de Barker en 1959, quien realizó pruebas para aumentar la formación de yemas laterales a partir de las bases de las hojas viejas que forman el pseudotallo. Además, se han ejecutado trabajos realizados de micropropagación masiva de diferentes genotipos de *Musa spp.*

Murashige y Skoog en 1962, citado por Forero (2011, 19), descubrieron que al adicionar cenizas de tabaco al medio de cultivo, pudieron observar que el crecimiento de los callos era cuatro o cinco veces superior al obtenido en medio de White. Estos investigadores demostraron que la parte estaba constituida por la fracción activa del extracto, lo cual marcó el punto de partida para el desarrollo del medio (MS), que en la actualidad se usa con éxito en el cultivo *in vitro* de muchas especies vegetales.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales en musáceas mediante yemas apicales de hijuelos, constituyen una de las prácticas más importantes de la biotecnológica para la obtención de grandes volúmenes de plantas de plátanos y bananos libre de plagas y enfermedades fúngicas y bacterianas, así como para la preservación de la estabilidad genética y en la conservación e intercambio de germoplasma (Medina *et al.* 2015, 48).

Esta estrategia, ha sido aplicada por varios investigadores en diferentes especies con buenos resultados para la propagación masiva de musáceas, Ortega *et al.* (2010) y Pérez *et al.* (2011) utilizando la técnica de inmersión temporal del cultivar de plátano vianda; Sandoval (1991, 2-3) la utilizó en la propagación de plátanos y bananos; Ríos *et al.* (2013, 137) para plátano «cambur manzano»; Uzcátegui (2010) en hartón doble tallo; Pérez *et al.* (2002) y Hoyos *et al.* (2008), en dominico hartón, en *Musa AAB cv enano*; Ortega *et al.* (2012, 206) en banano Williams (Medina *et al.* 2015, 47).

4. JUSTIFICACIÓN

Según reportes de la FAO (2012), el plátano se cultiva especialmente en países en vías en desarrollo de América, Asia y África. En Sudamérica es de general relevancia, por la generación de ingresos de divisas a los países productores y compradores, las oportunidades económicas que ofrece a los agricultores y a su entorno, de igual modo forma parte de la alimentación de las familias (Román *et al.* 2001, 2).

En el Ecuador, el plátano Barraganete es la variedad de preferencia para la exportación, por ser un cultivar altamente requerido por la población caribeña que habita en los Estados Unidos y Europa. El cantón el Carmen, de la provincia de Manabí, es la zona con mayor área de siembra, sin embargo en los últimos cinco años se ha extendido a las Provincias de Los Ríos, Guayas y Santa Elena (Toapanta *et al.* 2015, 1).

Mientras que, la variedad de plátano con mayor aceptación en países como Honduras y Colombia es el Curaré enano, el cual mantiene las mismas propiedades y características organolépticas y de proceso que otras variedades, pero posee altos rendimientos en campo, mayor cantidad de dedos después del desmane, longitud y grosor aceptable por el mercado y es de fácil manejo en campo (Caballero, 2010, 48). Sin embargo, a pesar de no existir reportes estadísticos de producción del cultivar Curaré en Ecuador, Vélez (2016¹), menciona que en el cantón El Carmen, la siembra de este material es progresivamente alta, debido a que el porte bajo de este cultivar permite implementar prácticas agronómicas que mejoran su eficiencia, tales como: acame y riego por goteo.

Medina *et al.* (2015, 48), indican que la mayoría de las especies comestibles del género *Musa* son partenocárpicas, no producen semillas y para su propagación se separan los hijuelos del corno madre, por lo expresado se deduce que la tasa de

¹ Vélez, Jefferson. 2016. Información personal. Profesor Principal de la Universidad Técnica de Manabí

propagación que se logra a partir de este método es muy baja además el riesgo de diseminación de plagas y enfermedades es mayor.

Con todo esto los investigadores reafirmando las bases de la totipotencia celular buscan una alternativa biotecnológica, como la técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, la cual permite la propagación masiva de varias especies vegetales, entre las que están las musáceas libres de enfermedades logrando que se realicen selecciones clonales de genotipos sobresalientes, sus características agronómicas, organolépticas y con adaptabilidad a un ambientes específicos, además de producirse durante todo el año por ser realizado en condiciones controladas de laboratorio (Medina *et al.* 2015, 48).

En general, en Ecuador, los productores de plátano desconocen los beneficios de utilizar plantas propagadas en laboratorio para establecer y renovar sus plantaciones, por lo que se requiere potencializar en el sector platanero el uso de cultivares *in vitro* de plátano los cuales presentan bajo rendimiento debido a la baja tecnología utilizada en el manejo agronómico y genético de este cultivo (Martínez 2004, 2).

Cabe mencionar que, la Universidad Técnica de Manabí de acuerdo a su artículo 5 del Reglamento de Becas² para los y las Estudiantes, establece que “las becas de graduación, consisten en la entrega por una sola ocasión de un bono de graduación que le permita al estudiante la adquisición de materiales o insumos de hasta USD\$ 4,000.00 (cuatro mil 00/100 dólares americanos) para estudiantes que están por realizar su trabajo de graduación en la modalidad que se establece en este reglamento”, otorgó USD\$ 4000, los mismos que sirvieron para la adecuación del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad, contribuyendo con ello al conocimiento técnico-científico-universitario con la finalidad de elevar el nivel académico de los estudiantes que se forman como Ingenieros Agrónomos en esta Facultad.

² Reglamento de Becas para los y las Estudiantes de la Universidad Técnica de Manabí, mismo que fue discutido y aprobado por el H. Consejo Universitario en sesiones del 23 de octubre y 8 de noviembre de 2012.

5. OBJETIVOS

General

Evaluar la respuesta de la combinación de bencilaminopurina y ácido indolacético en la propagación *in vitro* de dos cultivares de plátano *Musa AAB*: Barraganete y Curaré.

Específicos

1. Determinar el porcentaje de supervivencia de los explantes inoculados durante la fase de establecimiento de plátano (*Musa AAB*, cvs.: Barraganete y Curaré).
2. Evaluar el tiempo de respuesta de explantes de plátano (*Musa AAB* cv. Barraganete y Curaré) en condiciones *in vitro*.
3. Determinar la mejor concentración de citoquininas y auxinas para el desarrollo de los brotes *in vitro*.

6. MARCO REFERENCIAL

6.1.Descripción taxonómica

Las musáceas pertenecen a la clase de las monocotiledóneas, orden Zingiberales, familia Musaceae, e incluye a los géneros *Musa* y *Ensete*. El género *Musa* se divide en cuatro secciones: Autralimusa, Callimusa, Rhodochlamys y Emusa. Esta última sección comprende a las especies *M. acuminata* y *M. balbisiana*. Siendo el número básico cromosómico para la sección Eumusa $n = 11$, mientras que para las musáceas comestibles (*M. acuminata* y *M. balbisiana*) $n = 22$ (Simmonds 1962; Jiménez, 2004, 5).

La poliploidía y el genomio de cada cultivar está representado con A para indicar la procedencia de *M. acuminata* y con B para *M. balbisiana*, de esta forma las letras A y B sirven para la identificación de cultivares (Jiménez, 2004,8).

En la actualidad, los diploides comestibles son poco comunes ya que han sido desplazados por los triploides AAA más productivos, pero también más estériles. Los cruzamientos inter-específicos entre *acuminata* (AA) y *balbisiana* (BB), dieron origen a grupos identificados por la contribución respectiva de cada especie silvestre: AB, AAB y ABB (Simmonds, 1962; Román 2012, 12).

El nombre técnico usado hasta ahora es *Musa paradisiaca*; sin embargo, debido a que los plátanos son híbridos de *M. acuminata* y *M. balbisiana*, la genética moderna insiste en no usar este nombre y asignarlo como *Musa* AAB (CEDAF 2001, 8).

La clasificación taxonómica del plátano según Roskov *et al.* 2016 se define de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Zingiberales

Familia: Musaceae

Género: *Musa*

Genotipo: AAB

6.2.Origen y distribución

Según Cruz y Ruíz (2012, 1), el plátano (*Musa spp*), es un cultivo de mucha importancia en el trópico americano y en otras zonas tropicales del mundo. Todas las especies del género *Musa* conocidas actualmente, se derivan de una especie con semillas, originaria del archipiélago Malayo, Filipinas, y otras regiones de Asia suroccidental, pasando posteriormente a la India y África. En 1516, los europeos lo trajeron en América y las Antillas (Rodríguez y Guerrero, 2002).

Otros autores indican que el plátano a principios del siglo XX se convirtió en una de las principales especies más cultivadas y consumidas en América del sur y central, convirtiéndose en el cuarto cultivo de exportación (Vergara, 2010 ; Velásquez 2015, 7).

En la actualidad es un cultivo de amplia distribución, por su adaptación se encuentran entre los principales cultivos en los trópicos como subtrópicos. Sin embargo las mayores plantaciones comerciales se encuentran en los trópicos húmedos (Rodríguez y Guerrero 2002, 10; Ventura *et al.* 2015, 40).

6.3.Importancia económica y nutricional

Los bananos y plátanos se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo y son un componente importante en la alimentación de millones de personas. La producción mundial fue de 125'049.265 toneladas métricas en el año 2008, de las cuales el 27,46% correspondieron a cultivares de plátano (Foastat, 2010). Esta especie ocupa el cuarto lugar como el producto alimenticio más importante en el mundo, sobrepasados únicamente por el arroz, el trigo y los productos lácteos (Díaz y 2011, 32).

En Ecuador, la producción de plátano ha venido desde hace muchos años principalmente enfocada para el consumo interno, sin embargo en la presión de la

demanda externa de países como Estados Unidos y algunos de Europa, han impulsado la producción de plátano de buena calidad para esos mercados, teniendo su pico desde los años 1990 hasta 1997, cuando el volumen de exportación alcanza su punto máximo durante el periodo, para luego volver a tener importantes incrementos en los años 2000 y 2001 llegando a 113879,61 toneladas (Uribe, 2008; Cobeña, 2013, 4).

El cultivo de plátano en el país, es considerado la actividad económica más importante del sector agrícola, como cultivo de exportación representa un importante sostén para el desarrollo económico del sector. Mientras que desde el punto de vista social genera fuentes de trabajo y representa un eslabón significativo para la seguridad alimentaria de gran parte de la población, generando nuevas tasas de empleos para el agricultor ecuatoriano (Vargas, 2004; Ortega *et al.* 2010, 2).

Este fruto, es uno de los principales cultivos con grandes cantidades de almidón en países en vía de desarrollo, es consumido como un alimento que suministra altas porcentajes de energía y se usa en numerosas preparaciones gastronómicas (Barco *et al.* 2009, 71). Sus semillas son muy pequeñas lo que facilita su consumo. Es también apreciado por su característica digestiva lo que favorece la secreción de jugos gástricos, además es fuente de vitaminas B y C además de sales minerales como el hierro, fósforo, potasio y calcio. Debido a todos los factores mencionados anteriormente, el plátano, es parte esencial de la dieta de muchos países del mundo (Castillo y Corrales 2010, 1).

6.4.Descripción morfológica

Es un fruto que procede de una planta grande, herbácea, con una raíz perenne o denominada rizoma, de la cual salen sus generaciones futuras por medio de nuevos brotes. Principalmente en el trópico, presenta un tallo es anual el cual muere cuando madura el racimo y brota nuevamente a partir de las yemas del rizoma. Estos tallos o yemas son el medio de propagación asexual normal de la que nacen nuevas plantas además presenta un desarrollo tan rápido que el racimo suele estar maduro diez meses luego de la siembra de los brotes (Barco *et al.* 2009, 71).

En forma general, las musáceas se definen como plantas herbáceas, con pseudotallo aéreo, originándose de cormos o cepas camosas que dan origen al tallo, a yemas laterales y raíces adventicias (CEDAF 2001, 12).

Por su parte, Velásquez (2015, 8), manifiesta que presenta un tallo verdadero corto que permanece prácticamente enterrado, llamándole rizoma o bulbo, aunque Simmonds (1962), indica que lo correcto es llamarlo cormo.

El cormo, se define como un tallo subterráneo que desarrolla hojas en la parte superior y raíces adventicias en la parte inferior. De los nudos brotan raíces en grupos de cuatro. Las hojas se originan en la parte apical del tallo. La mayoría de las raíces salen de la parte superior, debajo de la inserción de las hojas, disminuyendo en número hacia la parte inferior. Por su parte, el pseudotallo es la parte aérea de la planta, y está formado por las vainas envolventes de las hojas, esta le ofrece a la planta apoyo y la capacidad de almacenar reservas amiláceas e hídricas (CEDAF 2001, 9).

La inflorescencia sale de la parte central superior del cormo, cuando se han emitido alrededor de 20 hojas, es cilíndrica, gruesa, de color blanco, y con nudos en los que se anidan las hojas. Por su parte las hojas son verdes oscuras en la parte superior y verde claro en la parte inferior. El fruto es partenocárpico, el cual se forma por el aumento en volumen de las paredes del ovario de las flores pistiladas. La posición del fruto varía a través del crecimiento del cultivar (CEDAF 2001, 10).

6.5. Cultivares de importancia comercial

6.5.1. Cultivar Barraganete

Según Fernández Cobeña (2013, 15), el plátano Barraganete (Horn Platain), parece ser originario de Indochina, Burneo, Siam y regiones cercanas. En el Ecuador se encuentra distribuido desde las fajas costeras hasta las estribaciones andinas, es cultivada específicamente en el cantón El Carmen, ubicada en la provincia de Manabí, y se ha extendido a la provincia del Guayas, en los últimos años (Cedeño y Ordóñez 2005, 19).

La importancia de este cultivar se ve reflejada en las hectáreas sembradas (115349,00 has en 2011) y una producción de 591.984 toneladas (FAO, 2012 citado por Cobeña, 2013,4). En Ecuador es una de las variedades de preferencia para la exportación, muy requerida por los habitantes del Caribe, que habitan en los Estados Unidos y Europa (Cedeño y Ordóñez 2005, 19),

El pseudotallo es más largo, presenta un menor número de manos y frutos, además de tener menor número de hijos que el cultivar Dominico (Vélez 2011, 19).

6.5.2. Cultivar Dominico

En esta variedad las vainas presentan manchas rojas en las vainas así como un pseudotallo verde. El racimo es visiblemente apretado con 7 a 10 manos, con 12 a 14 plátanos cada uno. Los frutos son delgados y alargados con un desarrollado pedúnculo (Vélez 2011, 19). Por su parte Camayo (2015, 24) indica que el potencial productivo se encuentra en relación inversa con la altitud, así que a mayor altitud afecta reduciendo el tamaño y menor peso del fruto.

6.5.3. Cultivar Dominico Hartón

Esta variedad es de fácil manejo, es similar al Curaré Enano y Barraganete, aunque la formación del racimo es similar al Dominico. Es muy débil genéticamente pues luego de dos o tres generaciones se vuelve Barraganete o Dominico (Vélez 2011, 19-20). Además el rendimiento de esta variedad se conserva estable dentro de las altitudes de siembra especificadas (Camayo 205, 24).

Es resistente al “Mal del Estriado”. Se obtienen rendimientos de 38 dedos comerciales por planta. Los dedos tienen la característica de ser rectos, y además muy dulces. Una desventaja de esta variedad es que el fruto es relativamente perecedero (López 2002, 5).

6.5.4. Cultivar maqueño

Posee un largo pseudotallo que puede alcanzar los cuatro metros de altura fácilmente, además se caracteriza por presentar un cierto vigor. Por su parte, el racimo es más pesado y grande que otros cultivares, alcanzando un peso hasta de

100 libras en suelos con buena fertilidad y riegos oportunos. Además los dedos son pequeños pero gordos (Vélez 2011 ,20).

6.5.5. Cultivar Curaré

Esta variedad es de muy fácil manejo, ya que, como su nombre lo indica es de tamaño pequeño, oscila entre los 2.5 y 3 m, con un promedio de 2.5 m, lo que permite realizar las labores rutinarias de una forma más rápida y la cosecha se realiza con mucha facilidad. Esta variedad además tiene la ventaja de que es mucho menos susceptible al acame debido a sus dimensiones. Es susceptible al ataque de *Sigatoka* por lo cual es necesario monitorear constantemente la presencia de esta enfermedad fungosa (López 2002, 4).

La distancia de siembra y el arreglo o distribución de las plantas en el campo, es una de las alternativas que pueden aumentar la producción significativamente, siempre que se dé un manejo adecuado a la plantación (Muñoz 2003, 41).

Es un cultivar poco difundido en el Ecuador, pero en países como Honduras, se cultiva en grandes extensiones. El Curaré Enano es un material el cual mantiene las mismas propiedades y características organolépticas y de proceso que otras variedades (Lardizábal y Gutiérrez 2006, 38; Caballero, 2010, 1). Según Solórzano (2012, 5), es un cultivo rendidor alcanzando en promedio 60 unidades por racimo (máximo 70, mínimo 50), así como 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. Todas estas características lo hacen muy aceptado para exportación; sin embargo es susceptible a las malas condiciones de manejo tales como falta de agua y fertilización.

6.6. Métodos de propagación

6.6.1. Método de propagación tradicional

La propagación vegetativa de las plantas sea esta in situ o ex situ, ocurren un sinnúmero de procesos fisiológicos dando lugar a formar una nueva planta parecida

a la planta que le dio origen Pierik 1990, 208). Cabe indicar que los procesos que se dan en la multiplicación asexual de las plantas es la organogénesis y la embriogénesis somática, ocurriendo estos procesos sea en plantas *in vitro* o *in vivo*, aunque en estas últimas se da de forma natural.

6.6.2. Método de propagación vegetal *in vitro*

Esta técnica consiste en escoger una pequeña sección de un tejido vegetal llamado explante o ápice, desinfectarlo externamente y luego sembrarlo en contenedores llenos de medios enriquecidos en condiciones de asepsia, permitiendo en poco tiempo un gran número de plantas en cualquier especie requerida (Oropeza 2007, 27).

Las técnicas del cultivo de tejidos, en especial las relacionadas con el saneamiento de enfermedades sistémicas y la propagación masiva y rápida, se han convertido en herramientas indispensables en el desarrollo de la agricultura, el mismo que comenzó a partir de la década del 50 (Montenegro *et al.* 2014, 147).

La multiplicación vegetativa *in vitro*, ha jugado durante muchos años una trascendental función en la agricultura. El cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, una de las aplicaciones que ha tenido mayor impacto y repercusión mundial, ha sido la propagación masiva de plantas o micropropagación. De hecho, este proceso biotecnológico ha sido el más utilizado para la obtención de plantas comerciales, mediante el uso de las *técnicas in vitro*, que no solo involucran los procesos de clonación, sino también las fases de micropropagación y los factores que la afectan. Esta aplicación biotecnológica ha permitido alcanzar multiplicaciones masivas de cientos de genotipos seleccionados en corto tiempo y a bajos costos en comparación con los procedimientos tradicionales de propagación (Pedroza 2008,11).

La biotecnología ofrece nuevas oportunidades para la seguridad alimentaria, ya que mediante esta técnica se obtienen clones de variedades élites en masivas cantidades, con un sin número de beneficios adicionales respecto a la propagación tradicional. Esta técnica facilita un riguroso control fitosanitario, producción de gran

cantidad de nuevos brotes en espacios pequeños y con buenas características equilibradas, plantas libres de microorganismos, facilitando la labor para el fitomejorador (Hoyos *et al.* 2008, 100).

Vasil (2008, 1432), considera que el desarrollo de esta técnica se debe en gran medida a la formulación de medios de cultivo con elevados porcentajes de sales minerales, particularmente de amonio, nitrato, potasio y fosfato como la formulación MS (Murashige y Skoog 1962), B5 (Gamborg *et al.* 1968, 153), entre otras. Estos compuestos, formulados inicialmente para la inducción de callos de *Nicotiana tabacum* y suspensiones celulares de *Glycine max*, respectivamente, en la actualidad se utilizan en una extensa diversidad de especies, taxonómicamente distantes (Montenegro *et al.* 2014, 148).

Actualmente el medio de cultivo MS es el más utilizado en cultivo de tejidos de numerosas especies y si bien no siempre se ha observado crecimiento óptimo de los explantes, por lo menos ha ocurrido un crecimiento inicial (Azofeifa *et al.* 2008 citado por Montenegro *et al.* 2014, 149).

- **Organogénesis**

Este método consiste en la obtención de órganos diferenciados partiendo de un pequeño explante inicial. Se puede dividir en dos vía organogénesis directa en la que se forman directamente del explante, o indirecta en la que los órganos forman primero un callo (tejidos no organizados) y posterior forman una nueva planta (Oropeza 2007, 27).

- **Embriogénesis somática**

Esta metodología es una ruta de regeneración celular que posibilita la formación de un embrión a partir de células somáticas y no como un producto de formación o fusión de gametos. Esta es la técnica teóricamente más rápida para obtener plantas masivamente (Ramírez *et al.* 2012, 97).

6.7. Importancia de la propagación *in vitro* de plátano

La micropropagación ofrece un extenso número de ventajas comparado sobre los sistemas de multiplicación habitual en cuanto a tasas de propagación, control sanitario y superficie requerida para la multiplicación de plantas. Además, el comportamiento agronómico del material propagado con esta técnica es similar o superior al material convencional (Fernández y Hernández, 2002, 2).

En los años 70, comenzó la propagación clonal *in vitro* a partir del cultivo de meristemos. La técnica, descrita por primera vez en platanera por Ma y Shii (1972), quienes implementaron rápidamente como método frecuente para la propagación de una gama de especies vegetales.

Por su parte, la propagación *in vitro* de plantas de *Musa* a escala comercial se ha consolidado en todo el mundo y la regeneración vía organogénesis mediante explantes se mantiene como el método mejor manipulado. Esto se debe principalmente a la posibilidad de multiplicar plantas libres de patógenos con una adecuada estabilidad genética. Las técnicas comerciales de micropropagación de plantas de *Musa* forman parte de la evolución de la agricultura y aportan a mejorar las condiciones fitosanitarias y de producción de las plantaciones (Cejas *et al.* 2011, 14).

La ineficiencia de los métodos de multiplicación *in vivo* para suplir la demanda de bananos y plátanos de calidad, genéticamente uniformes y libres de enfermedades, justifica la metodología de propagación *in vitro*, tales como, la propagación masiva mediante el uso de citocininas adicionadas a los medios de cultivo (Albarrán *et al.* 2006, 1; Florio y Mogollón 2011, 91).

La aplicación de las técnicas de micropropagación ha aportado en gran medida a los proyectos de mejoramiento de las zonas plataneras. Además ha proporcionado una fácil manipulación del germoplasma, facilitando tanto el intercambio de material vegetal como la preservación de los recursos genéticos (Fernández y Hernández 2002, 2).

6.8. Etapas o fases del cultivo *in vitro*

La micropropagación se divide en cinco fases que van desde la selección del material vegetal, desinfección del material vegetal, establecimiento aséptico del cultivo, multiplicación, enraizamiento y finalmente aclimatación en campo. En las dos últimas fases las citoquininas y las auxinas juegan un papel significativo (Hoyos *et al.* 2008, 100).

6.8.1. Selección del material vegetal

Uno de los principales factores que determinan el éxito del cultivo *in vitro* de una especie es la procedencia del explante que se utiliza, por lo que se puede modificar o alterar de acuerdo al objetivo de la técnica de cultivo *in vitro* que se utilice (Oña 2010, 12).

Una vez que se haya determinado cuál es la mejor planta para iniciar el cultivo, es necesario seleccionar el explante a usarse, lo cual depende de: el tipo de cultivo a iniciarse, el propósito del cultivo y la especie vegetal con la cual se trabajará (Méndez 2014, 9).

6.8.2. Desinfección del material vegetal

Una desinfección exitosa de la superficie del explante a emplearse es importante, debido a que si sobre el explante persiste algún microorganismo, ya sea hongo o bacteria, éstos destruirían el cultivo pues compiten con el explante por los nutrientes del medio, siendo ellos más exitosos por sus altas tasas de multiplicación y desarrollo acelerado (Roca y Mroginski 1991,9; Dávila 2011,14 Méndez 2014, 9)

Además existe una serie de agentes químicos que aportan a la desinfección de un material vegetal, dentro de estos agentes se pueden utilizar: alcohol al 70 %; hipoclorito de sodio en concentraciones de entre 1% y 3%, la principal fuente es el cloro comercial; otros desinfectantes usados con menor frecuencia es el hipoclorito de calcio (Roca y Mroginski, 1991, 9; Oña 2010, 13; Méndez 2014, 9).

6.8.3. Establecimiento aséptico del cultivo

Para esta fase ya se cuenta con el material vegetal desinfectado y los medios de cultivo preparados y estériles con lo cual se empieza a la etapa de establecimiento, en la que el explante es introducido en el medio de cultivo bajo condiciones de asepsia, generalmente, en cámara de flujo laminar en donde se reducen las posibilidades de contaminación del explante o del medio de cultivo. Posteriormente los frascos que contienen a los explantes son llevados a la sala de incubación donde permanecerán hasta observar cambios favorables o negativos (necrosis o contaminación) (Roca y Mroginski, 1991, 113; Oña 2010, 16; Méndez 2014, 13).

6.8.4. Multiplicación

Si las fases anteriores fueron superadas con éxito fue superada con éxito y el explante ha respondido favorablemente a los componentes del medio de cultivo y a las condiciones de incubación, se van observando cambios formando nuevos tejidos en el explante; este tejido puede ser fragmentado y trasladado a nuevos medios de cultivos en el cual podrá seguir desarrollándose, dando lugar a la formación de tejido indiferenciado o formación de brotes (Oña 2010, 17).

De modo general, se emplean medios de cultivo diferentes en las fases de introducción y multiplicación de cualquier especie, con el fin de conseguir una organización celular adecuada (Cubero 2003, 482; Méndez 2014, 13).

6.8.5. Enraizamiento

Luego de la etapa de multiplicación es necesario dar paso al proceso de enraizamiento en los brotes propagados *in vitro*, lo cual requiere generalmente el traspaso a un nuevo medio de cultivo.

Para esta fase los medios utilizados son diferentes con nuevas incorporaciones de reguladores de crecimiento, con el objetivo de inducir la emisión de un sistema radicular, entre las que se encuentran: disminución de la concentración de sales,

cambio en el balance hormonal a favor de auxinas exógenas, eliminación de citoquininas exógenas o disminución de la fuente de carbono (Roca y Mroginski 1991, ; Oña 2010,17; Méndez 2014, 14).

6.8.6. Aclimatación en campo

Cuando las plántulas tengan un adecuado sistema radicular homogéneo, las pequeñas plántulas son llevadas a invernadero donde tienen que hacer frente a una serie de factores hostiles que no están preparadas fisiológicamente.; las plántulas han crecido y desarrollado en ambientes con humedades relativas muy altas por lo que sus estomas no son funcionales de modo parcial o completamente; además, las plántulas no cuentan con cutícula para impedir la pérdida de agua y la desecación de las plántula (Castillo 2004, 4; Oña, 2010, 17-18; Méndez 2014, 15).

6.9. Medios de cultivo

El medio de cultivo es concluyente para el éxito de la regeneración y propagación *in vitro* de plantas. Cada especie vegetal tiene requisitos particulares de nutrición y condiciones ambientales propias para su crecimiento y desarrollo; por lo tanto, el medio de cultivo para cada especie vegetal presenta una composición determinada y diferente, sin embargo en el (ANEXO 1) se detallan los componentes básicos de un medio de cultivo de Murashige y Skoog (Ramírez *et al.* 2012, 51).

Mezcla de sales inorgánicas.- en esta se incluyen elementos generales requeridos para los diferentes procesos metabólicos y fisiológicos de las plantas, en los que se encuentran; los macronutrientes los cuales son necesarios en mayores cantidades para el crecimiento de las plantas. Entre ellas se encuentran el carbono, hidrogeno y oxígeno, además tienen demanda de nitrógeno, fosforo, potasio, magnesio, calcio y azufre. También podemos encontrar micronutrientes, que se precisan en mínimas concentraciones en la nutrición vegetal, pero que resultan esenciales para las actividades metabólicas de las plantas. Entre estos podemos encontrar: manganeso, hierro, zinc, boro, cobre, cobalto y molibdeno (Ramírez *et al.* 2012, 52).

Compuestos orgánicos.- Estos compuestos son los de tipo: carbohidratos, reguladores de crecimiento y vitaminas/aminoácidos.

Las **vitaminas** son necesarias en pequeñas cantidades e intervienen en muchas reacciones metabólicas. En los medios de cultivo por lo general se usan mezclas de vitaminas, principalmente del grupo B, que incluyen la tiamina (Vitamina B1), ácido nicotínico (Vitamina B3), la piridoxina (Vitamina B6), y el aminoácido glicina (Ramírez *et al.* 2012, 53).

El mio-inositol no es considerado como una vitamina, aunque con frecuencia es adicionada en el medio de cultivo junto con las vitaminas. Es un producto involucrado en una de las vías metabólicas de las células metabólicas como en el transporte de azúcares, metabolismo de los carbohidratos y formación de la pared y membrana celular (Ramírez *et al.* 2012, 53).

Los **gelificantes** son utilizados en los medios para los cultivos *in vitro* ya sean líquidos o semisólidos, lo cual depende de la presencia o no de sustancias gelificantes. Estos compuestos solidifican el medio de cultivo y brindan una matriz que sirve de sostén al explante. El agar es el polisacárido más utilizado para los medios de cultivo. Las concentraciones varían entre 0,6% y 1%. Además del agar existen otros gelificantes comerciales como el Phytigel, el Bactoagar, el Gelrite, entre otros (Ramírez *et al.* 2012, 54).

Los **reguladores de crecimiento (RC)**, son sustancias producida en un tejido específico de la planta, que cuando es transportada en bajas concentraciones a otra parte de la misma planta puede actuar como señal para estimular o inhibir el crecimiento o regular alguna actividad fisiológica. Los principales RC se concentran en auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. Sin embargo, se reconocen otros compuestos que también ejercen efectos sobre el crecimiento y desarrollo vegetal, pero que no ejercen efecto distancia, entre ellos: poliaminas, ácido jasmónico, brasinólidos, entre otros (Ramírez *et al.* 2012, 65).

Los RC en el medio de cultivo determinan la vía de desarrollo que un explante incubado en condiciones apropiadas puede seguir. Estos reguladores tienen una función específica en el desarrollo *in vitro* de un explante. Las auxinas, las citoquininas y las giberelinas son los principales reguladores de crecimiento utilizados en un medio de cultivo para la propagación *in vitro* (Ramírez *et al.* 2012, 66).

Según Ramírez *et al.* (2012, 66), las auxinas tiene la función de inducir la elongación celular en tallos y coleoptilos (principal responsable del fototropismo y del gravitropismo) y la dominancia apical (inhibición del desarrollo de la yema apical presente de la auxina AIA).

Por su parte, las citoquininas son compuesto derivados de la adenina las cuales promueven la división celular y la citocinesis en células y tejidos vegetales. Se encuentran especialmente en tejidos en división, como los meristemos, la semilla en germinación, los frutos y las raíces (Ramírez *et al.* 2012, 67).

6.10. Desinfectantes

Son varios los productos utilizados para separar de las superficies vegetales el gran número de microorganismos, que pueden llegar a contaminar el medio de cultivo y reducir la prosperidad del mismo (Sanes 2002, 35).

Como desinfectante de superficie el más utilizado es el hipoclorito de sodio (NaOCl), se consigue como blanqueador y contiene hipoclorito de sodio entre 5-6%. Así mismo aparece el hipoclorito de calcio utilizado para desinfectar comúnmente materiales. Sin embargo, el hipoclorito de calcio puede llegar a causar toxicidad en algunos tejidos (Sanes, 2002, 35).

Cabe indicar que antes de manipular cualquier desinfectante se debe dosificar las concentraciones a utilizar, así como el tiempo durante la desinfección dependiendo del material vegetal en estudio (Sanes 2002, 36).

Muchas veces es oportuno incluir en el protocolo de desinfección el uso de un tensoactivo como el Tween 20, en bajas concentraciones (0,1%), siempre y cuando sea utilizado antes de colocar el alcohol. La función del mismo es romper la tensión superficial permitiendo que agentes químicos entren en contacto con el material vegetal (Cedeño 2015, 15).

6.11. Condiciones ambientales del cultivo

En términos generales, se debe de mantener una temperatura promedio de 26 a 28°C, con una intensidad luminosa de 3000 lux y con una humedad relativa de 70%, para producir plantas *in vitro*. Por su parte, en especies del género *Musa* se ha observado que no es exigente en la intensidad luminosa y cuando le da luz directa del sol, o cuando las lámparas son de mayor potencia (120w), se da una pérdida de la coloración de las plantas, seguramente por la degradación de la clorofila, además de un aumento de la tasa respiratoria del explante (Sanes 2002, 23).

7. DISEÑO METODOLOGICO

7.1. Localización del ensayo

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ingeniería Agronómica de la Universidad Técnica de Manabí, durante los meses de julio del 2016 a enero del 2017. El laboratorio se localiza en la parroquia Lodana km 12½ vía Portoviejo-Santa Ana, Provincia de Manabí, Ecuador y ubicada geográficamente a 01° 09' de latitud sur y 80° 21' de longitud oeste a una altitud de 47msnm.

7.2. Material vegetal

Para la investigación se utilizó material vegetal de cormos (hijos espada) de plantas madres seleccionadas con características sanitarias y morfológicas apropiadas de dos cultivares de plátano (Barraganete y Curaré), los cuales fueron colectados de un lote de multiplicación establecido en la finca Experimental La Teodomira (Figura 2), de la Facultad de Ingeniería Agronómica, ubicada en la parroquia Lodana del Cantón Santa Ana.

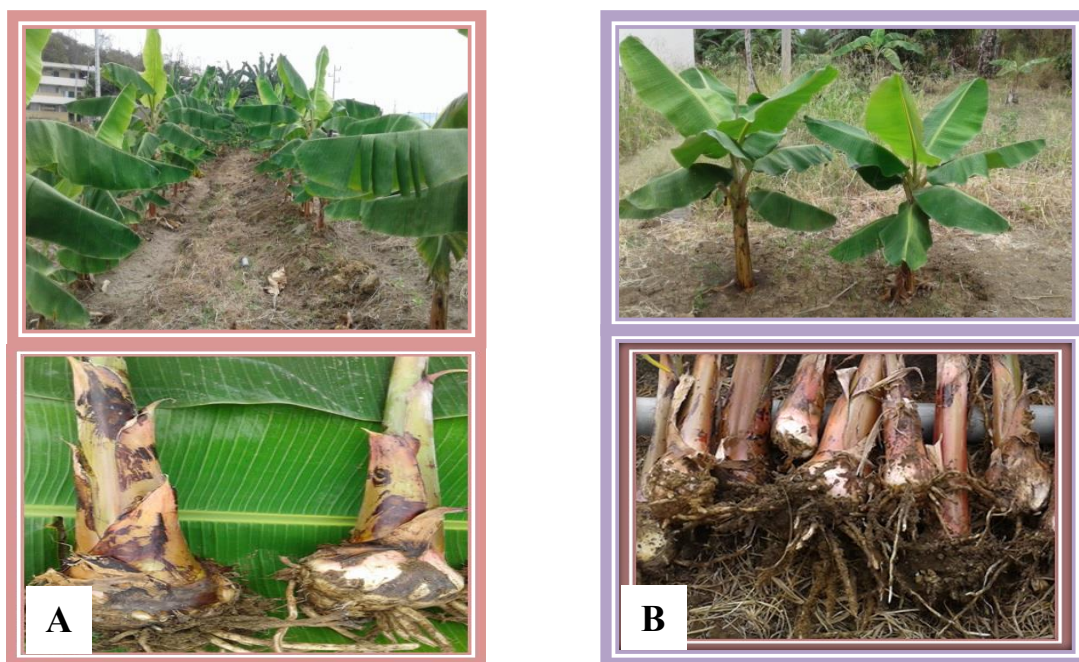


Figura 2. Material de propagación (hijos espada) de los cultivares utilizados: A) Material de propagación de plátano cv. Barraganete. B) Material de propagación de plátano cv. Curaré.

7.3. Medio de cultivo

El medio utilizado fue la formulación de Murashige y Skoog (1962), (Anexo 1), suplementado con vitaminas, sacarosa (30gr/l) y gelificante (Gellan Gum 3gr/l). Este se ajustó a un pH de $5,7 \pm$ incorporándole 0.01N de NaOH, 0,1N de HCl y esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos, el medio fue colocado en tubos de ensayos con 10 ml para la fase de establecimiento y en vasos de polipropileno con 20ml para la fase de multiplicación.

7.4. Condiciones de cultivo

Los frascos de los diferentes tratamientos fueron colocados en condiciones de cultivo en el cuarto de incubación con una temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo de 16 horas luz, intensidad lumínica de 1500 lux, y una humedad relativa de 70%.

7.5. Metodología

Para el establecimiento del material de plátano *in vitro*, se utilizó la metodología descrita por Sandoval (1991), adaptada por Macías (1994), con algunas modificaciones (Anexo 2).

7.5.1. Factores en estudio

Factor A: Materiales utilizados

Niveles del factor A

C1. Cultivar Curaré

C2. Cultivar Barraganete

Factor B: Dosis de hormonas

Niveles del factor B

T0 = Sin Hormona; “testigo”

T1 = 3 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA

T2 = 4 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA

T3 = 5 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA

T4 = 3 mg L^{-1} BAP + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ AIA

T5 = 4 mg L^{-1} BAP + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ AIA

T6 = 5 mg L^{-1} BAP + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ AIA

7.5.2. Tratamientos

Tabla 2. Tratamientos aplicados en la fase de multiplicación *in vitro* de explantes de plátano (cvs.. Barraganete y Curaré).

Materiales utilizados	Dosis de hormonas		Tratamientos
	BAP (mg/l)	AIA (mg/l)	
Cultivar Barraganete	0	0	P1T0 = Barraganete: Sin Hormona; “testigo”
	3	0,1	P1T1 = Barraganete: 3 mg L ⁻¹ BAP + 0,1mg L ⁻¹ AIA
	4	0,1	P1T2 = Barraganete: 4 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ AIA
	5	0,1	P1T3 = Barraganete: 5 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ AIA
	3	0,3	P1T4 = Barraganete: 3 mg L ⁻¹ BAP + 0,3mg L ⁻¹ AIA
	4	0,3	P1T5 = Barraganete: 4 mg L ⁻¹ BAP + 0,3mg L ⁻¹ AIA
	5	0,3	P1T6 = Barraganete: 5 mg L ⁻¹ BAP + 0,3mg L ⁻¹ AIA
Cultivar Curaré	0	0	P2T0 = Curaré: Sin Hormona; “testigo”
	3	0,1	P2T1 = Curaré: 3 mg L ⁻¹ BAP + 0,1mg L ⁻¹ AIA
	4	0,1	P2T2 = Curaré: 4 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ AIA
	5	0,1	P2T3 = Curaré: 5 mg L ⁻¹ BAP + 0,1 mg L ⁻¹ AIA
	3	0,3	P2T4 = Curaré: 3 mg L ⁻¹ BAP + 0,3mg L ⁻¹ AIA
	4	0,3	P2T5 = Curaré: 4 mg L ⁻¹ BAP + 0,3mg L ⁻¹ AIA
	5	0,3	P2T6 = Curaré: 5 mg L ⁻¹ BAP + 0,3mg L ⁻¹ AIA

AIA= Acido indol-acético

BAP= 6-Bencilaminopurina

7.5.3. Diseño experimental

Los datos obtenidos en la fase de establecimiento de esta investigación, fueron analizados mediante estadística descriptiva. Mientras que en la fase de multiplicación se utilizó un diseño completamente al Azar (DCA) en Arreglo Factorial (2x7). El mismo que incluyó 14 tratamientos (combinaciones de cultivar por dosis de hormonas) y 3 repeticiones.

Tabla 3. Análisis de varianza

Fuente de variación	GL
Repeticiones	2
Tratamientos	13
A	1
B	6
A*B	6
Error	26
Total correcto	41

7.5.4. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados mediante un análisis de varianza utilizando el procedimiento ANOVA en el programa estadístico IMB SPSS Statistics 21, y la comparación de medias se efectuó mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.01\%$).

7.6. Manejo del ensayo

7.6.1. Establecimiento de ápices de plátano cultivares Barraganete y Curaré en laboratorio

Se utilizaron cormos de hijuelos de plantas seleccionadas de plátano cvs.. “Curaré” y “Barraganete” obtenidos del lote de multiplicación, a los cuales se eliminaron las partes externas y vainas foliares del cormo (Figura 2A) hasta obtener secciones de 3cm de base y 5cm de altura colocándose en un vaso de precipitación de 1000ml donde se lavaron con jabón líquido por 5 minutos y se procedió a enjuagar con abundante agua corriente (Figura 2B y C). Enseguida el material fue colocado en un otro vaso de precipitación se llevó a condiciones de asepsia (cámara de flujo laminar) para la desinfección, en donde en frascos esterilizados se colocaron las secciones de plátano con el fin de desinfectarlos, utilizando hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5.25% y gotas de Tween-20 colocados en agua esterilizada durante 20 minutos, para finalmente enjuagar por cuatro ocasiones con agua esterilizada (Figura 2D).

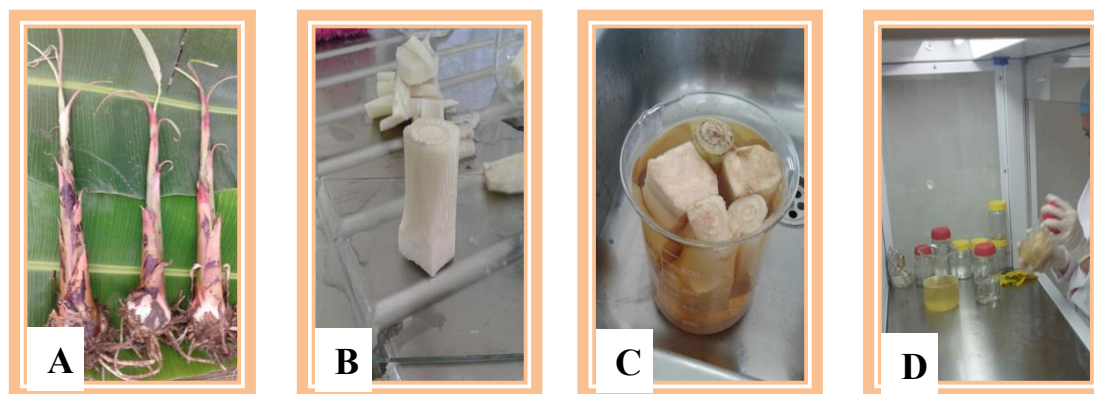


Figura 2. Limpieza y desinfección de cormos de plátano cvs.. Barraganete y Curaré: A) Hijos espada de plantas seleccionas. B) Secciones del cormo de 3cm de base y 5cm de altura. C) Desinfección del material de campo con jabón líquido. D) Desinfección y enjuague de los explantes.

Luego de realizar el proceso de desinfección dentro de la cámara de flujo laminar, se procedió con ayuda de hojas estériles de bisturí a eliminar las partes externas del explante (Figura 3 A) con la finalidad de reducir el tamaño de los explantes, hasta alcanzar una altura de 2cm y 1,5cm en la base (Figura 3 B), y se colocaron en una solución antioxidante de cisteína 50 mg/l. hasta el momento de la siembra (Figura 3C).

Para la siembra se procedió a sacar los explantes de la solución de cisteína colocándolos en papel kraft estéril para eliminar el exceso de agua, para lo cual se utilizaron pinzas estériles colocadas en alcohol al 90° las cuales fueron flameadas en un mechero de alcohol. Los tubos previamente contenían el medio de cultivo (Figura 3D) luego sembraron cada explante en los tubos de ensayo (Figura 3E), posteriormente se sellaron con cinta parafilm además de etiquetarlos según cada material (Figura 3F). Los tubos utilizados para esta fase no contenían reguladores de crecimiento, quedando ahí por cuatro semanas.

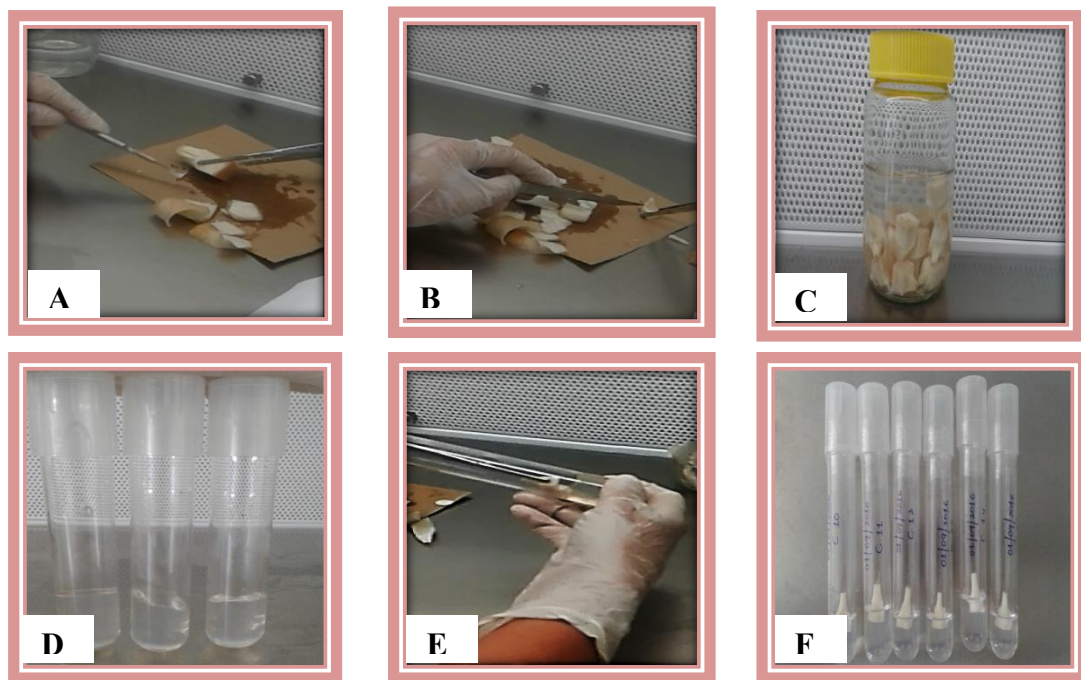


Figura 3. Siembra de ápices de plátano cvs. Barraganete y Curaré en medio de establecimiento:
A) Eliminación de partes externas del explante. B) Explante reducido a 2cm de altura y 1,5cm en la base. C) Explantes colocados en solución de cisteína, por 10 minutos. D) Tubos de ensayo dispensados con medio MS. E) Siembra de los explantes en el medio de establecimiento. F) Explantes en el cuarto de cultivo *in vitro*.

Variables analizadas

- Porcentaje de sobrevivencia

Se evaluó el número de explantes contaminados por bacterias y hongos, así como también aquellos que presentaron necrosis por oxidación fenólica. Las evaluaciones tuvieron una duración de un mes y se realizaron semanalmente a partir de la siembra.

- Tiempo de respuesta

Se registró el tiempo de respuesta en días de cien explantes, desde el momento del establecimiento hasta la observación de cambios en la coloración o aparición de las primeras hojas o brotes. Esta variable se evaluó una sola vez en cada explante en esta fase.

7.6.2. Determinación de la mejor concentración de citoquininas y auxinas para el desarrollo de los brotes *in vitro*

Para iniciar la fase de multiplicación se utilizaron los explantes de cuatro semanas que se adaptaron y sobrevivieron en la fase de establecimiento (Figura 4A), para lo cual con ayuda de la pinza esterilizada y colocada en alcohol al 90° se flameaba en el mechero para coger el explante y colocarlo en el papel kraf estéril, para cortar con el bisturí (Figura 4B), la parte superior (primera hoja o alargamiento del talluelo) e inferior (base del explante) del explante, para posteriormente sembrar los explantes (Figura 4C) de cada genotipo en los vasos de polipropileno que contenían los medios de cultivo con las combinaciones y concentraciones hormonales (seis tratamientos más el testigo), para proceder a sellarlos y etiquetarlos antes de sacarlos de la cámara de flujo laminar.

Las hormonas utilizadas en esta fase fueron una auxina (Ácido indolacético-AIA) y una citocinina (6-bencilaminopurina/6-BAP), incorporado en el (Alvarez, y otros 2013)medio base formulado de MS (Murashige y Skoog, 1962).

En el momento de iniciar el primer subcultivo el explante fue colocado entero en el vaso conteniendo el medio de cada tratamiento (Figura 4 D), posteriormente

al iniciar el segundo subcultivo los pequeños explantes se partieron por la mitad (Figura 4E). Los subcultivos de los pequeños brotes producidos se realizaron cada 3 semanas, colocando los explantes en un nuevo medio, hasta finalizar el cuarto subcultivo.



Figura 4. Fase de multiplicación de ápices de plátano (Barraganete y Curaré): A) Explante de cuatro semanas listo para fase de multiplicación. B) Decapitación del explante en la base y primeras hojas. C) Siembra de explantes en los vasos en cada tratamiento. D) Explante entero para iniciar el primer subcultivo. E) Explante partido longitudinalmente para iniciar el segundo a cuarto subcultivo. F) Explante con los primeros brotes en el segundo subcultivo.

7.6.2.1. Variables analizadas

- Número promedio de brotes emitidos

Para determinar esta variable a los 21 días después de la siembra (DDS), se contabilizó el número promedio de brotes emitidos por explante, para lo cual se tomaron 6 brotes por tratamiento, en forma aleatoria. Esta evaluación se realizó en cada subcultivo, hasta el final del periodo de incubación, en ambos genotipos de plátano.

- **Longitud de brotes**

En condiciones de cámara de flujo, se midió la longitud de quince brotes por tratamiento en cada subcultivo en forma aleatoria, cada 21 DDS de iniciado el subcultivo en cada cultivar de plátano. Los datos fueron registrados en centímetros (cm), donde se utilizó un calibrado pie de rey esterilizado en autoclave.

- **Diámetro de brotes**

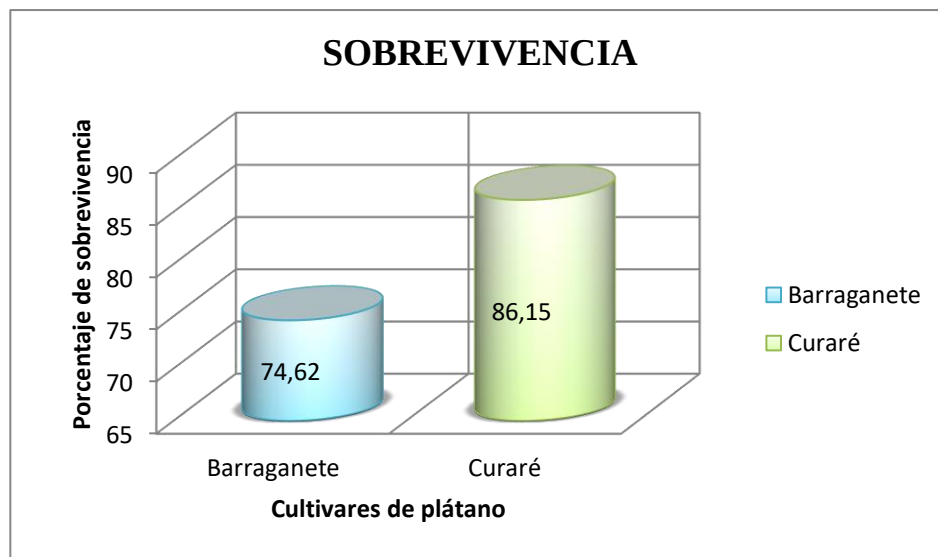
A los 21 días DDS de cada subcultivo, se registró el diámetro de quince brotes por tratamiento en forma aleatoria, para la medición se utilizó un calibrados pie de rey esterilizado. Los datos fueron registrados en milímetros (mm).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Porcentaje de contaminación

En el establecimiento se presentó contaminación para ambos genotipos estudiados, presentando para el cv. Curaré 86.15% y el cv. Barraganete 74.62% de sobrevivencia (Figura 5A) con la metodología utilizada en el ensayo (Gráfico 1), resultados que podríamos considerarlos aceptables en relación con los demostrados por López (2015, 29-30), los cuales utilizando una metodología de 10% de cloro y tiempo de inmersión de 90min presentaron el 50% de sobrevivencia en el cv. Barraganete.

Gráfico 1.
Porcentaje de sobrevivencia de explantes de plátano cvs. Barraganete y Curaré en la fase de establecimiento *in vitro*.

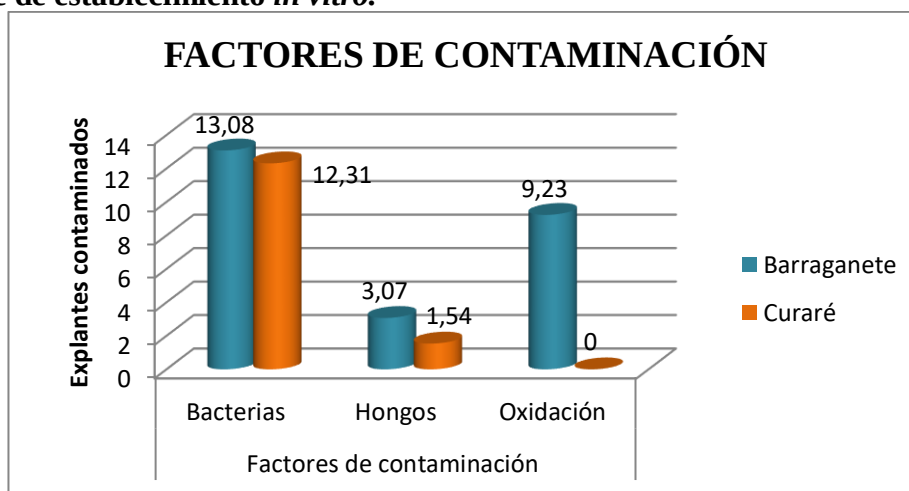


De la misma manera, los resultados obtenidos en este ensayo, se pueden comprar con los reportados por Gutiérrez (1996, 29), donde utilizando una metodología similar se presentó 85% de sobrevivencia para el clon de banano Cavendish. Mientras que Ortega *et al.* (2012, 215), indican que con un protocolo más exhaustivo con doble desinfección se obtuvo un 69% de sobrevivencia en explantes a los 7 días de establecido el ensayo.

Se debe resaltar que, en los trabajos de Uzcátegui *et al.* (2010, 8), muestran que en la fase de establecimiento presentaron 75% de sobrevivencia en el cv. Hartón y en el mismo trabajo un 60% de sobrevivencia en el cv. Hartón “Doble Tallo” utilizando el protocolo establecido por Colmenares y Giménez (2003), en el que se realizaba un triple lavado con varios desinfectantes. Estos ensayos demuestran que el protocolo de desinfección utilizado en esta investigación, es más fiable para reducir las pérdidas de explantes por agentes contaminantes en la fase de establecimiento. Sin embargo, en la metodología de desinfección utilizada por Canchignia *et al.* (2008, 44), muestran que un tratamiento de 20% de cloro comercial, durante 20 minutos + 0,1% de bicloruro de mercurio por 10 minutos, tuvo un 100% de sobrevivencia en explantes de plátano variedad Maqueño.

La fase de establecimiento es sumamente delicada y exige todas las medidas de asepsia posible, de lo contrario, aumentarían los riesgos de contaminación por hongos y bacterias (Figura 5B-C) los cuales se observaron a partir de los cinco días de establecido el ensayo, afectando la calidad y cantidad del material inicial. Por su parte, además se presentó contaminación bacteriana en ambos cultivares 13,08% en Barraganete y 12,31% en Curaré. Mientras que el porcentaje de contaminación causada por hongos 3,07% en el cv. Barraganete y 1,54% en el cv. Curaré (Gráfico 2).

Gráfico 2.
Porcentaje de contaminación en explantes de plátano cv. Barraganete y Curaré en la fase de establecimiento *in vitro*.



Es importante resaltar lo reportado por Ancasi *et al.* (2016, 107), quiénes trabajando con una metodología similar de desinfección presentaron un 72% de sobrevivencia en explantes de plátano dentro de los cuales tuvieron un 16,6% de explantes contaminados por hongos, siendo ese porcentaje superior a lo demostrado en este ensayo, lo cual pueden deberse a la asociación del medio con el explante, condiciones de introducción del material, así como la fuente de origen del material vegetal, de ahí la importancia de introducir plantas sanas y en condiciones óptimas (Mroginski y Roca 1991, 114).

El presente ensayo, a pesar de observarse oxidación (Figura D), los índices fueron bajos en el cv. Barraganete 9.23% y en el cv. Curaré no se presentó oxidación fenólica de los meristemos (Gráfico 2). Estos resultados difieren a los reportados por Uzcátegui *et al.* (2010), quiénes reportan en el cv. Hartón y Doble Hartón un 20 y 65% de necrosamiento. En la investigación se presentaron registros con altos índices de oxidación generalizada, además con altos porcentajes de mortalidad a diferencia de los demostrados por este ensayo en el que el cv. Curaré no se presentó fenolización y en el cv. Barraganete tuvo un bajo porcentaje aunque no se adiciono ningún reactivo a diferencia de otras investigaciones.

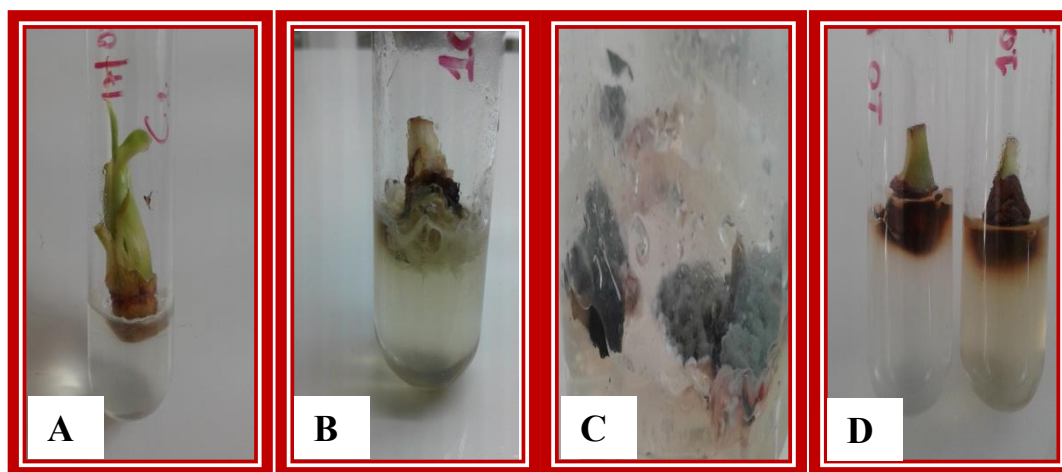


Figura 5. Sobrevivencia y factores de contaminación de los explantes en fase de establecimiento: A) Explante sano. B) Explante contaminado con bacteria. C) Explante contaminado con hongo. D) Agente con signos de necrosamiento.

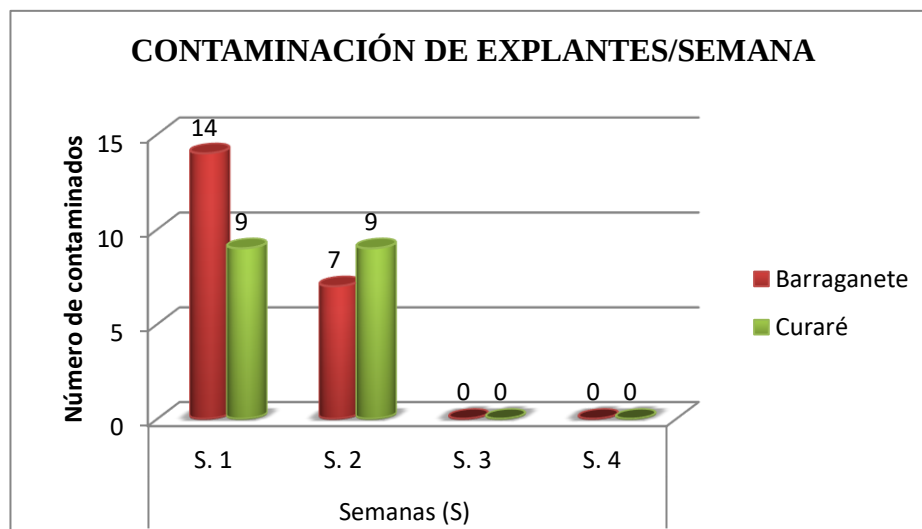
Cabe mencionar que en un estudio realizado con clones de banano Williams se utilizó carbón activado incorporado al medio obteniendo excelentes resultados

con la adición de 1gr/litro de carbón al medio en total oscuridad favoreciendo la reducción del fenómeno, ya que estas sustancias oxidoreductoras presentes en las vacuolas y citoplasma catalizan reacciones en presencia de luz y posteriormente afectan la viabilidad de los explantes (Ramírez *et al.* 2008, 55).

Azofeifa (2009, 155), manifiesta que la oxidación en los explantes constituye un frecuente y serio problema desde el establecimiento y durante el mantenimiento de un cultivo *in vitro*, por lo que luego de ser cortados, muchos de los explantes empiezan a perder el color verde e inician un oscurecimiento, ocasionando que se liberen con frecuencia exudados oscuros al medio de cultivo, cuyo origen no es precisó, aunque se conoce que son una mezcla compleja de sustancias fenólicas.

Cabe indicar que otra condición tomada en cuenta en el ensayo fue el tiempo en aparecer los contaminantes, observándose que los explantes mostraron síntomas por bacterias y hongos en las primeras semanas de iniciado la fase de establecimiento (Gráfico 3).

Gráfico 3.
Porcentajes de los factores de contaminación de explantes de plátano cv. Barraganete y Curaré en la fase de establecimiento *in vitro*.

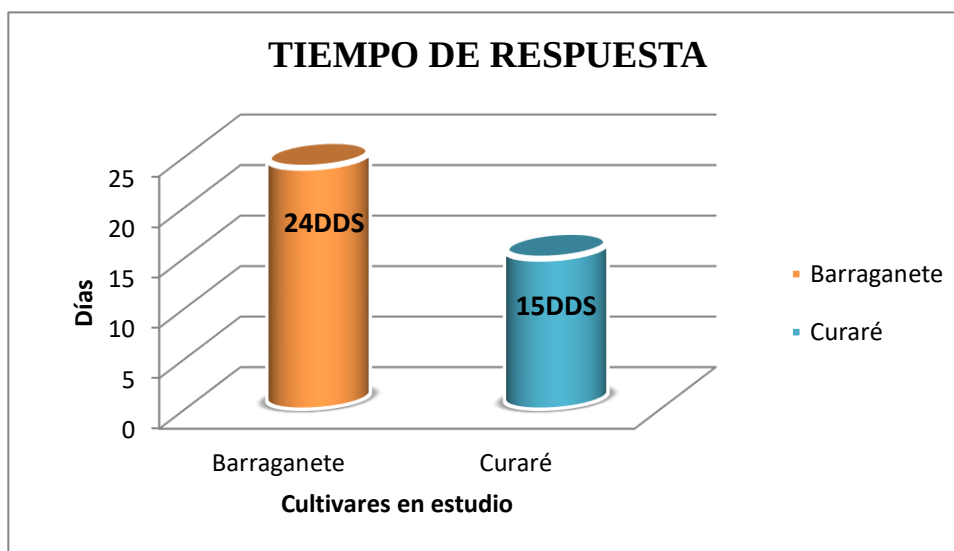


8.2. Tiempo de respuesta

En la fase de establecimiento además se evaluó el tiempo de respuesta, observándose que el cultivar que presentó menor tiempo cuando se observaron cambios aparentes en color y consistencia de los explantes en los medios de establecimiento fue el cv. Curaré a los 15 DDS, mientras que el cv. Barraganete manifestó cambios significativos a los 24 DDS (Gráfico 4). Aunque esta variable se evaluó en la fase de establecimiento sin la adición de ningún regulador de crecimiento, trabajos previos realizados por Tandazo *et al.* (2014, 122), reportan que aunque se suplementó el medio con 3 mg L⁻¹ de BAP en explantes de banano clon Cavendish se obtuvo manifestación en los explantes a los 23 días, siendo esta respuesta igual a los reportes de este ensayo para el cv. Barraganete. Sin embargo la respuesta del cv. Curaré (15 días), fue mejor que la mostrada el clon Cavendish a pesar que dicho clon contenía BAP en el medio, así mismo se reporta en el mismo experimento que adicionando más cantidad de BAP al medio (5 mg L⁻¹) se tarda más en responder el explante que sin la adición de ninguna hormona adicional.

Gráfico 4.

Tiempo de respuesta de explantes de plátano cv. Barraganete y Curaré en condiciones *in vitro* durante la fase de establecimiento expresado en días.



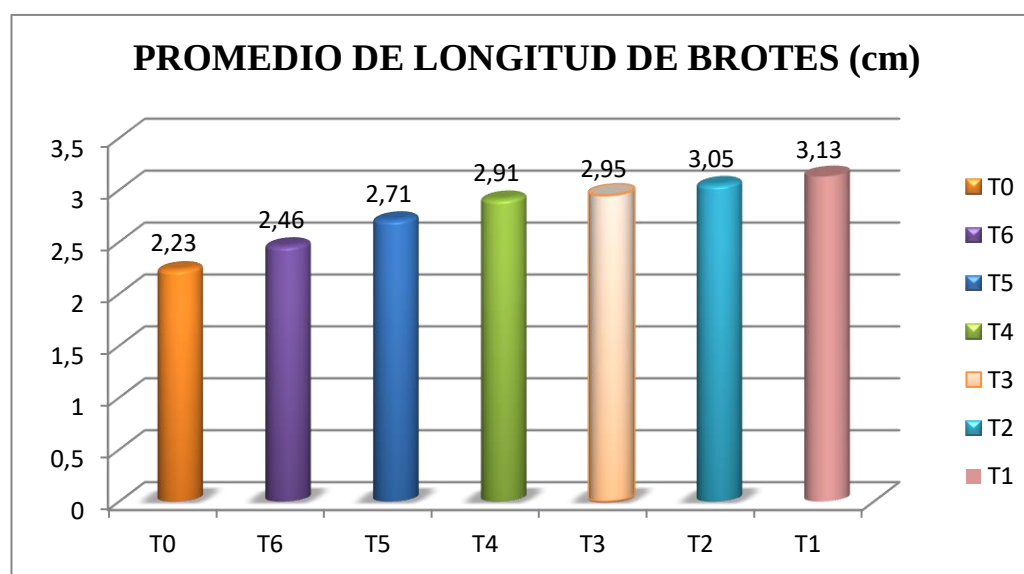
DDS (Días después de la siembra de los meristemos)

8.3. Longitud de brotes

El análisis de varianza (Anexo 3), muestra diferencias estadísticas significativas correspondientes a las dosis, pero no hay diferencia en los materiales utilizados y a la interacción de los factores. El mejor promedio se obtuvo al utilizar 3 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA con una altura promedio de 3,13 cm en ambos materiales en comparación con las otras dosis utilizadas (Gráfico 5). Por lo cual Saucedo (2008), manifiesta que una pequeña cantidad de citocinina puede ser sintetizada por los brotes en crecimiento, sin embargo se conoce que es insuficiente para promover el crecimiento y elongación *in vitro* de yemas y brotes, razón por la cual en la propagación *in vitro* de plátano los medios utilizados fueron adicionados con citocininas ayudando en el crecimiento de los nuevos brotes, por ello al usar una dosis relativamente baja de BAP combinada con una auxina en nuestro ensayo favoreció a la elongación de los brotes, mostrando que la dosis ya mencionada es la adecuada para promover la longitud de los brotes en estos cultivares de plátano en condiciones *in vitro*.

Gráfico 5.

Respuesta de la longitud de brotes de plátano cv. Barraganete y Curaré, en la fase de multiplicación



T0= Testigo; T1=(3 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA); T2= (4 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA); T3 (5 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA); T4= (3 mg L^{-1} BAP + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ AIA); T5= (4 mg L^{-1} BAP + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ AIA); T6= (5 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA)

Siendo este valor superior a los reportado por Canchignia *et al.* (2008), quienes estudiando el plátano, variedad maqueño utilizaron dosis de 3 mg L^{-1} BAP + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ AIA en los explantes evaluados a los 28 días, obteniendo como promedio 2.32cm de longitud.

Cabe indicar que a pesar de que el análisis de varianza no mostró significancia en la interacción, el tratamiento con mejor promedio fue el P2T1 (3 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA) para el cultivar curaré, mientras que para el cultivar barraganete el mejor tratamiento se obtuvo con P1T2 (4 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA) (Anexo 4), determinando posiblemente que, con concentraciones altas de citocininas y auxinas se obtienen mayores longitudes de brotes.

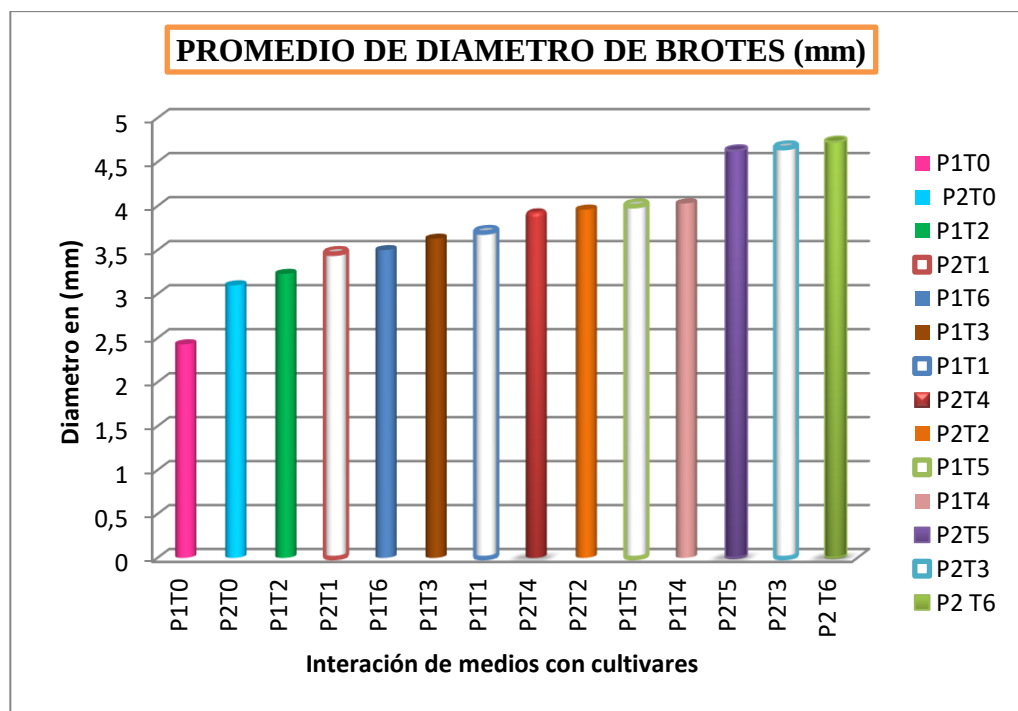
8.4. Diámetro de los brotes

En el análisis de varianza realizado, se muestra que los valores son altamente significativos entre los materiales, las dosis y significativo en la interacción de los factores estudiados (Anexo 5). Dentro de la cual se determinó que la mejor dosis de hormona para los materiales estudiados fue T5 (4mg/L BAP/ 0.3 mg/L AIA) con una media de 4,31 mm de diámetro; por lo contrario la no adicción de hormonas al medio (Testigo absoluto) presentó los valores más bajos (2,76 mm).

Por su parte la prueba de comparación de medias para la interacción de materiales con dosis hormonales (Anexo 6), muestra que se presentaron cuatro grupos, indicando que el mejor promedio lo presentó la combinación P2T6 (5 mg L^{-1} BAP + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ AIA) en el cultivar Curaré, mientras que en el cultivar Barraganete la mejor combinación fue P1T4 (3 mg L^{-1} BAP + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ AIA) y la menor respuesta para ambos materiales se obtuvieron con los testigos (Gráfico 6).

Gráfico 6.

Respuesta del diámetro de brotes de plátano cv. Barraganete y Curaré en la fase de multiplicación, en las diferentes combinaciones hormonales



Barraganete: P1T0= (testigo); P1T1= (3 mg L-1 BAP + 0,1 mg L-1 AIA); P1T2= (4 mg L-1 BAP + 0,1 mg L-1 AIA); P1T3= (5mg L-1 BAP + 0,1 mg L-1 AIA); P1T4= 3 mg L-1 BAP + 0,3 mg L-1 AIA; P1T5=(4 mg L-1 BAP + 0,3 mg L-1 AIA); P1T6= (5 mg L-1 BAP + 0,3 mg L-1 AIA)
 Curaré: P2T0= (testigo); P2T1= (3 mg L-1 BAP + 0,1 mg L-1 AIA); P2T2= (4 mg L-1 BAP + 0,1 mg L-1 AIA); P2T3= (5mg L-1 BAP + 0,1 mg L-1 AIA); P2T4= 3 mg L-1 BAP + 0,3 mg L-1 AIA; P2T5=(4 mg L-1 BAP + 0,3 mg L-1 AIA); P2T6= (5 mg L-1 BAP + 0,3 mg L-1 AIA)

Lo expresado es ratificado por los reportes de Hoyos *et al.* (2008), quienes manifiestan que las auxinas tienen la capacidad de producir un ensanchamiento celular; así como promover la formación de raíces, así que un balance hormonal entre auxinas y citocininas es la clave para mantener una proporcionada división celular y el crecimiento de la región meristemática presente en las yemas que a su vez ayudan a la proliferación de brotes (Norberto 2007, 136).

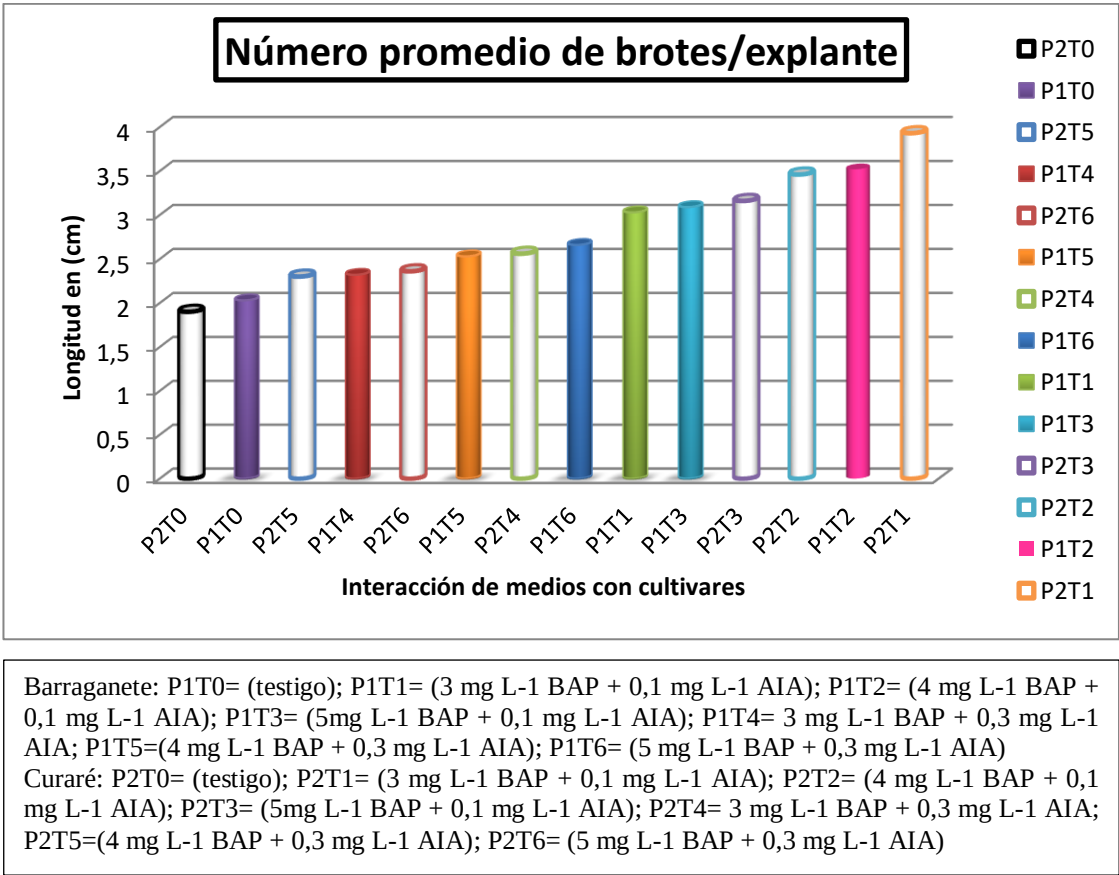
8.5. Número promedio de brotes/explante

El análisis de varianza determinó que se presentaron diferencias altamente significativas en las dosis y en la interacción de los factores estudiados (Anexo 7), para lo cual realizando la prueba de Tukey de los datos obtenidos se determinó que

la mejor dosis de hormona para los materiales utilizados fue 4 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ AIA. Sin embargo, la comparación de medias realizada mostró siete grupos diferentes estadísticamente para los tratamientos (Gráfico 7), indicando que el mejor tratamiento presentó un promedio de 3,93 brotes/explante el cual se obtuvo usando el T1 (3 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ AIA) y 3,46 brotes/explante usando el T2 (4mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ AIA) en el cultivar Curaré. Por su parte en el caso del cultivar Barraganete la mejor respuesta fue 3,52 brotes/explante usando el T2 (4 mg L⁻¹ BAP + 0,1 mg L⁻¹ AIA) (Anexo 8). Los datos obtenidos en el ensayo son corroborados por Dávila (2011, 24), quien indica que la cantidad utilizada de citocinina en relación de la auxina determina la diferenciación celular de los tejidos para la formación de brotes o raíces, por lo que se menciona que a mayor concentración de citocinina en relación a las auxinas ayudan a la proliferación de brotes.

Gráfico 7.

Respuesta del número promedio de brotes/explante de plátano cv. Barraganete y Curaré en la fase de multiplicación.



Mientras que, los datos obtenidos en este ensayo difirieron de los datos reportados por Hoyos *et al.* (2008), quienes usando explantes de plátano Dominico Hartón obtuvieron una mejor respuesta (5.75 brotes/explante) en la que adicionaron al medio base 5 mg L⁻¹ BAP+ 0.3 mg L⁻¹ AIA. Por otra parte, los resultados obtenidos se pueden comparar con trabajos similares reportados Florio *et al.* (2010, 433), donde utilizaron explantes de plátano “Hartón Gigante” sometidos a multiplicación con dosis elevadas de 5mg L⁻¹ de BAP en medio semisólido tuvo un promedio de 1,56 brotes/explante.

Otra investigación realizada por Tandazo *et al.* (2014, 123), en la que utilizando dosis mayores (5 mg L⁻¹ BAP) obtuvieron menor incidencia de brotes promedio (0,78 brotes/explante) en explantes de banano clon *Cavendish*; el mismo autor indica que al utilizar 3 mg L⁻¹ BAP presentó la mayor tasa de brotación, con un promedio de 2,56 brotes/ explante, indicando que a pesar de usar la misma dosis de citocininas se obtuvo un menor número de brotes/explante.

La relación entre auxinas y citocininas determina el tipo de crecimiento: a favor de auxinas se produce mayor crecimiento de raíces y a favor de citocininas se produce mayor crecimiento vegetativo. En yemas, la relación favorable a citocininas estimula diferenciación a yema vegetativa y favorable a auxinas estimula diferenciación a yema reproductiva (Stoller 2005, 5).

Una observación realizada durante el ensayo fue la aparición de explantes anormales los cuales reducían el número de brotes obtenidos, porque estos brotes denominados “ciegos” se eliminaban e cada subcultivo por no ser considerados brotes que pudieran regenerar o formar un nuevo brote por lo contrario seguían generando más explantes ciegos, los cuales se expresaron principalmente en los tratamientos con una mayor dosis de auxinas, por lo que mantener un balance hormonal para el normal funcionamiento de los explantes es importante observando que altos contenidos de auxinas en el medio reducen el poder efectivo de la citocinina.

9. CONCLUSIONES

1. En la fase de establecimiento el cv. Barraganete mostró una respuesta tardía al iniciar a manifestar cambios visibles en los explantes, por su parte el cv. Curaré mostró precocidad en los cambios apreciables a pesar de ser cultivares parecidos morfológicamente.

2. En las evaluaciones realizadas con respecto a la longitud de los brotes en los cultivares de plátano en condiciones de laboratorio muestran que el mejor promedio se obtuvo al utilizar 3 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA con una altura promedio de 3,13 cm en ambos materiales, en comparación con las otras dosis utilizadas.

3. En el caso de la variable diámetro de brotes se determinó que la mejor dosis de hormona para los materiales estudiados fue T5 (4 mg/L BAP/ $0,3 \text{ mg/L}$ AIA) con una media de 4,31 mm de diámetro, y para el cultivar Curaré la mejor respuesta la presento T6 (5 mg L^{-1} BAP + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ AIA), mientras que en el cultivar Barraganete la mejor combinación fue T4 (3 mg L^{-1} BAP + $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ AIA) y la menor respuesta para ambos materiales se obtuvieron con los testigos.

4. Por su parte, el número promedio de brotes/explante mostró que el mejor tratamiento presentó un promedio de 3,93 brotes/explante el cual se obtuvo usando el T1 (3 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA) y 3,46 brotes/explante usando el T2 (4 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA) en el cultivar Curaré. Por su parte en el caso del cultivar Barraganete la mejor respuesta fue 3,52 brotes/explante usando el T2 (4 mg L^{-1} BAP + $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ AIA).

10.RECOMENDACIONES

- La metodología utilizada en el ensayo para el establecimiento de explantes de plátano resultó factible para los cultivares de plátano con bajos índices de contaminación principalmente por hongos, por lo que podría ser utilizada para posteriores trabajos con los cultivares en estudio.
- Utilizar dosis más bajas de Ácido Indolacético (AIA), en próximos ensayos, ya que los tratamientos con mayor concentración de Ácido Indolacético aumentan la cantidad de producción de brotes ciegos en ambos cultivares estudiados, reduciendo así la cantidad de brotes viables y vigorosos en los subcultivos posteriores.
- Evaluar otras concentraciones y combinaciones hormonales para ampliar el rango de alternativas en el uso de reguladores de crecimiento.
- Continuar con las siguientes fases de enraizamiento y posterior aclimatación de las plántulas en el invernadero.

11.BIBLIOGRAFÍA

1. Álvarez Elizabeth, Ceballos Germán., Gañan Lederson, Rodríguez David, González Silverio y Pantoja Alberto. 2013. “*Producción de material de “siembra” limpio en el manejo de las enfermedades limitantes del plátano*”. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), N° 384: 1
2. Albarrán, José, González Oytza, Torrealba, María, Salazar Efraín y Trujillo Iselen. 2006. “*Propagación masiva de plantas de banano mediante cultivo de ápices caulinares utilizando sistema de biorreactores*”. En: Congreso Nacional de Fruticultura (Ed.): 1
3. Ancasi Ruth, Montero Julio, Ferreira Napoleón y Muñoz Israel. 2016. “*Determinación un mejor medio de cultivo e la fase de establecimiento para la propagación in vitro de plátano (Musa Paraisiaca L.)*” Journal of the Selva Andina Research Society, Vol. 7 N° 2: 107.
4. Azofeifa, Álvaro 2009. “*Problemas de oxidación y oscurecieminto de explantes cultivados in vitro*”. Agronomía Mesoamericana N° 20, Vol.1: 155.
5. Ball, Ernesto. 1946. “*Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of Tropaeolum majus L. and Lupinus albus L*”. 33: 305.

6. Barco Paola, Burbano Andrea, Medina Maira, Mosquera Silvio y Villada Héctor. 2009. “*Efecto de recubrimiento natural y cera comercial sobre la maduración del banano (Musa sapientum)*” Rev.Bio.Agro, Vol. 7 No. 2: 71.
7. Caballero, Venancio. 2010. “*Evaluación de la producción de plátano de la variedad Curaré enano en función de dos épocas de siembra y tres programas de fertilización en Zamorano, Honduras*”. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica. Honduras, 1-2.
8. Camayo, Jair. 2015. “*Estado actual mejoramiento genético del plátano y el banano*”. Tesis de maestría, Universidad Nacional Abierta y a Distancia Colombia –UNAD: 24
9. Canchignia Hayron, Sigcha Luis, Toaquiza José, Ramos Luis, Saucedo Silvia, Carranza Mercedes y Cevallos Orly. 2008. “*Alternativas para la propagación in vitro de plátano variedad maqueño (Musa balbisiana AAB)*”. Ciencia y Tecnología, Quevedo, 1: 44-46
10. Caplin, Shery y Steward, Fernand. 1948. “*Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. Science*”. 108: 655.
11. Castillo, Alicia. 2004. “*Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*”. Uruguay, 4: INIA.

12. Castillo Jairo y Corrales Rolando. 2010. *“Estudio de factibilidad para producción y exportación de plátano en Agrícola Ganadera CCP, Choluteca Honduras”*. Tesis de grado, Zamorano Carrera de Administración de Agronegocios. Zamorano: 1.
13. CEDAF. 2001. *“El cultivo de plátano”*. En: Guía técnica N° 28. 2da edición. República dominicana: 8-12.
14. Cedeño, Emilio. 2015. *“Micropropagación de banano orito (Musa acuminata AA) a partir de meristemos florales”*. Tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil, Daule-Ecuador: 15.
15. Cedeño Gabriel y Ordóñez Jeniffer. 2005. *“Factibilidad de exportación de plátano barraganete (Musa paradisíaca) hacia el mercado chileno”*. Tesis de pregrado. Universidad Laica “Vicente Rocafuerte” de Guayaquil, Ecuador: 19.
16. Cejas Inaudis, Capote Iris, Aragón Carlos, Escalona Maritza, Pina Danilo, Gonzáles Justo, Rodríguez Roberto, Noceda Carlos, Cañal María, Sandoval Jorge y Roels Sophie. 2011. *“Optimización del protocolo de propagación del plátano cv. CEMSA ¾ e Biorreactores de Inmersión Temporal”*. Cuba. Agrociencia Uruguay - Vol 15 N°1: 14.
17. Cobeña, Fredy. 2013. *“Análisis comparativo de los costos e índices financieros en parcelas pequeñas medianas y grandes en la producción de plátano en el cantón El Carmen”*. Tesis de pregrado, Universidad Nacional de Loja: 4, 15.

18. Cruz Luis y Ruíz Durlin. 2012. “*Métodos para acelerar la emisión y desarrollo de hijuelos en plátano (Musa sp) en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras*”. Zamorano, Honduras: 1
19. Cubero José. 2003. “*Introducción a la mejora genética vegetal*”. 2da edición Madrid, Ediciones Mundi-Prensa. 482.
20. Dávila, Wilson. 2011. “*Evaluación de la actividad hormonal de: thidiazuron (TDZ), thidiazuron con ácido α -naftalen acético (TDZ/ANA) vs. 6-bencil amino purina (BAP), 6-bencil amino purina con ácido α naftalen acético (BAP/ANA); como inductores de brotes en la etapa de multiplicación a partir de yemas apicales de balsa (Ochroma lagopus)*”. Tesis de pregrado, Escuela Superior Politecnica del Ejercito-Sangolquí: 14, 24.
21. Díaz Jesús y Castro Dagoberto. 2011. “*Propagación clonal in vitro de plantas de banano (Musa AAA) clon “Giant Cavendish” en biorreactores de inmersión temporal*”. Revista Universidad Católica de Oriente, N°31: 32.
22. FAO. 2012. “*Producción de cultivos*”. Roma-Italia: 7.
23. FAO. 2014. “*Segundo plan de acción mundial para los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura*”. Roma-Italia. p 7.
24. FAOSTAT (División de Estadísticas de la FAO). 2011. En línea: www.faostat.fao.org

25. FAOSTAT (División de Estadísticas de la FAO). 2010. “*Base de datos estadísticos FAOSTAT*”. Disponible en: <http://www.faostat.fao.org>
26. Fernández Domingo y Hernández Pedro. 2002. “*Actividad del ICIA en Platanera*”. En Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, 2.
27. Florio S y Mogollón, N. 2011. “*Efecto de dos citocininas y dos estado físicos del medio de cultivo sobre la multiplicación in vitro del plátano “Hartón Gigante” (Musa AAB)*”. Rev. Fac. Agron. (LUZ). N° 1: 91
28. Florio Sunshine, De Real Luis. y Mogollón Norca. 2010. “*Regeneración in vitro del plátano cv. Hartón Gigante (Musa AAB)*”. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. Vol. 44, N°. 4: 433
29. Forero, Gustavo. 2011. “*Estado del ate de la biotecnología en Colombia*”. Universidad EAN. Colombia, 18-19.
30. Gamborg O, Miller R y Ojima, K. 1968. “*Nutrient requirements of suspensión culures of soybean root cel*”¹. Exp. Cell. 50: 153
31. Gutiérrez, Jannethe. 1996. “*Micropropagación in vitro del clon de banano (Musa sp.) Enano ecuatoriano (AAA)*”. Tesis de grado, Universidad Nacional Agraria, Sede Nicaragua: 29.

32. Hoyos José; Perea Crispulo y Velasco Renaldo. 2008. “*Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormona en la micropropagación del plátano dominico Hartón (Musa AAB Simmonds)*”. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Vol 6. No. 2: 99-100.
33. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, EC. 2012. Consultado el 05 de junio de 2016.
34. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, (INIAP). 2008. “*Estado de los Recursos Fitogenéticos para la Agricultura y la Alimentación en Ecuador*”: 12
35. Jiménez A. 2004. “*Micropropagación de plátano (Musa AAB, cv curaré) en un medio con sustitución de insumos*”. Costa Rica. Tesis en línea. 5,8-9.
36. Jordán Miguel y Casaretto José. 2006. “*Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas*”. Ediciones Universidad de La Serena Chile, Vol. 15, 2-3.
37. Lardizábal R y. Gutiérrez H 2006. “*Manual de producción de plátano de alta densidad*”. USAID-RED: 38
38. López, Oscar. 2002. “*Manual de producción de plátano basado en la experiencia de Zamorano*”. Proyecto Especial del Programa de Ingeniería en Ciencia. Universidad de Zamorano, Honduras, 4-5.

39. López, Paola. 2015. “Estandarización de un protocolo de cultivo *in vitro* para el increment de biomasa de los callos de plátano (*Musa spp.*) variedad Barraganete”. Tesis de pregrado. Universidad de las Americas, UDLA: 29-30.
40. Macías Fátima y Sotomayor Ignacio. 1994. “*Propagación "in vitro" de musáceas*”. INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Programa de Café. Quevedo, Ecuador. (Boletín Divulgativo N°. 245). 3-9.
41. MAGAP (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca). 2015. Cultivo de banano: Superficie Producción y Rendimiento [Base de datos en línea]. Ecuador: 3
42. Martínez Gustavo, Tremont Omar y Hernández Julitt. 2004. “*Manual técnico para la propagación de Musáceas*”. Revista Digital CENIAP. Venezuela. N° 4: 2
43. Medina Miguel, Medina Cindy y Medina Luz. 2015. “*Propagación in vitro de Musa acuminata (Simmunds) plátano bocadillo del Chocó, Colombia, a partir del cultivo de meristemas apicales*”, Rev. Biodivers. Neotrop. 5, 1: 47-49.
44. Méndez, Marcel. 2014. “*Efecto de cinco dosis de quitosano para el establecimiento in vitro del plátano dominico hartón (Musa AAB Simmonds) en la zona de Daule*”. Para obtener título de pregrado, Universidad de Guayaquil. Sede Daule, 9, 13-15.

45. Montenegro F, Rojas C, Quevedo D y Delgado G. 2014. “*Efecto del suploagy complejos orgánicos como sustitutos parciales del medio de cultivo de micropropagación de Musa sp. cv. Cavendish*”. Agronomía Costarricense N°38, Vol. 1: 147-149.
46. Muñoz, Carlos. 2003. “*Prueba de cuatro densidades y tres arreglos espaciales de siembra en plátano*”. Costa Rica. N° 1, Vol. 16: 41
47. Murashige, T y Skoog F. 1962. “*A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*”. Physiol. Plant. 15:477
48. Navarrete Carolina, Umaharan Path, Debouck Daniel, García Sergio, Fuller, Carlos, Gibson Norman, Jarvis Andrew, Castañeda Nora y Nowak, Andrea. 2013. “*Recursos fitogenéticos: Bases para un futuro resiliente al clima y libre de hambre en el Caribe*”. Políticas en Síntesis No. 10. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) 6,
49. Norberto Carlos, Pretel Orlando, Reyna Wilson y Mercado Doris. 2007. “*Efecto de 6-bencilaminopurina y ácido indolacetico en la micropropagación in vitro de yemas de Dianthus caryophyllus L. clavel*”. Revista Med. Vallejana. Vol. 4, N° 2: 136.

50. Oropeza, Mayra. 2007. “*Determinación de la variabilidad genética en plantas regeneradas in vitro*”. XVII Con. Ven. Bot. Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela: 27

51. Oña, Lorena. 2010. “*Evaluación del efecto de brasinoesteroides en las etapas de establecimiento, multiplicación y enraizamiento in vitro de banano variedad Williams*”. Tesis- Carrera de Ingeniería en Biotecnología. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolquí: 12-13, 16-18.

52. Ortega D, Tamayo A., Calderón J. y Galván R. 2012. “*Establecimiento aséptico en la micropropagación in vitro de banano Williams (AAA, subgrupo Cavendish)*”. Tierra Tropical, 7 (2): 206, 215.

53. Ortega N; Korneva, S; Ruiz, O; Santos, E; Peralta, E. 2010. “*Obtención de multimeristemas y callos de diferentes variedades de Banano y Plátano (Musa spp.) a partir de Meristemas Apicales y Scalps*”. Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Guayaquil, Vol. 23, N. 1: 2.

54. Paz Rubén y Pesantez Zoila. 2013. “*Potencialidad del plátano verde en la nueva matriz productiva del Ecuador*”. Revista Científica YACHANA. Vol 2, N° 2: 206-207.

55. Pedroza, José. . 2008. “*Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones in vitro*”. Universidad Distrital Francisco José de Caldas: 11.

56. Pérez Milagro, Medero Victor, Torres Marlenys, López Jorge, Santos Arletys, Royas Aymé, Bauta Maricel, Beovidez Yoel y Ortega Alexis. 2011.

“Nueva alternativa para la micropropagación en inmersión temporal del cultivar de plátano vianda INIVIPV-2011”. Rev. Colomb. Biotecnol, Vol. XV No. 1: 98.

57. Pierik Roger. 1990. *“Cultivo In vitro de las Plantas Superiores”*. Madrid, España. Ediciones Mundi-Prensa: 208

58. Pro Ecuador (Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones). 2015. *“Análisis sectorial: plátano 2015”* Ecuador: 6.

59. Ramírez Hernando, Guevara María, Escobar Roosevelt. 2012. *“Cultivo de tejidos vegetales: conceptos y prácticas”*. Edición Alberto Ramírez. Universidad Nacional de Colombia. Cali, Colombia: 19-20, 51-54, 65-67, 97.

60. Ramírez Maribel, Lindorf Helga, García Eva. 2008. *“Cambios morfoanatómicos en los ápices y del vástago y de la raíz del banano Williams (Musa sp. AAA) bajo distintas concentraciones de N6- bencil Adenina”*. J Agricult Univ Puerto Rico. 92 (1-2): 55.

61. Reglamento de Becas para los y las Estudiantes de la Universidad Técnica de Manabí, mismo que fue discutido y aprobado por el H. Consejo Universitario en sesiones del 23 de octubre y 8 de noviembre de 2012

62. Ríos Gleymis, Añez Neirice, Bracho Belkys. Araujo Deisy, Suárez Hallely y Nava Juan. 2013. *“Cultivo in vitro de yemas, tratadas con benciladenina,*

provenientes de cormos enteros o seccionados de plátano Cambur Manzano". Bioagro, N° 25, Vol 2: 137.

63.

64. Robinson John y Galán Víctor. 2012. "*Plátanos y bananas*". 2da edición. Ediciones Mundi- Prensa. Madrid: 137-138.

65. Roca William y Mroginski Luis. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicación. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Unidad de Investigación en Biotecnología y Unidad de Comunicaciones, Cali, Colombia: 9, 113-114, 130.

66. Rodríguez Manuel y Guerrero Mauricio. 2002. "*Guía técnica: Cultivo de plátano*". CENTA: Centro Nacional de tecnología agropecuaria, El Salvador: 8-10.

67. Román, Carlos. 2012. "*Consideraciones epidemiológicas para el manejo de la Marchitez por fusarium (Fusarium oxysporum f sp. cubense) del banano en la región central del Perú*". Tesis de maestría, Centro Agronómico Tropical de investigación y enseñanza, ORTON- CATIE. Costa Rica: 10-12.

68. Román María, Alonso, M, González, C., Xiqués, X., y Sánchez, I. 2001. "*Estudios de la variabilidad en clones triploides de plátano fruta (Musa spp)*", Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales, Facultad de Biología, Universidad de la Habana: 2.

69. Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Flann C., Bailly N., Kirk P., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., eds. 2016. “*Species 2000 & ITIS Catalogue of Life*”, 27 de junio de 2016 de www.catalogueoflife.org/col

70. Sandoval Jorge; Brenes Gilbert; Pérez Luis. 1991. “*Micropropagación de plátano y banano (Musa AAB, AAA) en el CATIE*”. CATIE. Serie Técnica. Informe técnico N° 186, 2-3

71. Sanes, Sixto. 2002. “*Establecimiento y micropropagación masiva in vitro de Musa balbisiana (Hibrido FHIA-21), mediante el cultivo de meristemos apicales*”. Título de grado, Universidad de Sucre, Colombia, 35-36.

72. Saucedo, Stefano. 2008. “Efecto de los reguladores de crecimiento para la propagación in vitro de la Malanga (*Xanthosoma sagittifolium* L). Ciencia y tecnología Vol 1: 18-20.

73. Solórzano, Melvin. 2012. “*Impacto sobre el rendimiento del cultivo plátano (Musa paradisiaca L.) producto de la producción de la variedad Curare Enano Dominico Hartón (AAB, chifle), en parcelamiento La Blanca, Ocos, San Marco, en el periodo 2004-2009*”. Licenciatura en Ciencias Agrícolas, Universidad Rafael Landívar, Sede Regional de Coatepeque: 5.

74. Stoller Jerry. 2005. Guía Stoller de Sanidad Vegetal. Houston, Stoller Group Inc: 5.

75. Tandazo Anabel, Eras Victor, Minchala Julia, Yaguana Magaly y Poma Ruth. 2014. "*Propagación in vitro de banano, mediante la utilización de meristemos caulinares*", Bosques Latitud Cero. Vol.4; 121-123.

76. Toapanta Jéssica., Mite Francisco y Sotomayor Ignacio. 2015. "*Efecto de la fertilización y altas densidades de plantas sobre el rendimiento del cultivo de plátano, de la zona de Quevedo*". VIII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. 1.

77. Torres Ramiro, Andrade Ricardo, Tirado Diego y Acevedo Diofanor. 2015. "*Influencia del grado de madurez en la firmeza del plátano Hartón (Musa AAB Simmonds)*". Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient. Vol. 18, N° 2: 563

78. Uzcátegui Juan, Hernández Yvo, Osorio, Dagmary y Rivas Miledy. 2010. "*Evaluación del comportamiento in vitro de ápices de plátano (Musa AAB) cv. Hartón y Hartón Doble Tallo*". Producción Agropecuaria/ Biotecnología. Vol. 3, N°1: 7-8.

79. Vasil, I. 2008. "*A history of plant biotechnology: from the cell theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. Plant Cell*" Rep. 27: 1432.

80. Velásquez, María. 2015. "*Control de la calidad en el cultivo del plátano barraganete (Musa paradisiaca)*". Obtención de tecnólogo, en pregrado, Universidad Agraria del Ecuador, Balzar- Ecuador: 7-8.

81. Vélez Mayra. 2011. “*Reacción de diez cultivares de Musa spp. al ataque de picudo negro (Cosmopolites sordidus) durante el primer año de establecimiento*”. Tesis de pregrado, Santo Domingo, Ecuador: 19-20

82. Vélez, Jefferson. 2016. Información personal. Profesor Principal de la Universidad Técnica de Manabí.

83. Ventura José, López Jorge, Rodríguez Sergio, Medero, Vega, Gonzáles Lianet, Ventura Vaniert, Reinaldo Damisela, Torres Marlenys, Montano Nery, Gálvez Juan, Valdés María y Triana Osvaldo. 2015. “*Obtención de mutantes de porte bajo por irradiaciones en el cultivar “Zanzíbar” (Musa spp, Grupo AAB)*”. Cuba. Rev. Agricultura Tropical Vol. 1 No. 1: 40

12.ANEXOS

Anexos 1.

Tabla 1. Composición del medios básico de Murashige y Skoog (1962).

MACRONUTRIENTES	
ELEMENTO	CONCENTRACIÓN (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650.00
KNO ₃	1900.00
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440.00
MgSO ₄ .7H ₂ O	370.00
KH ₂ PO ₄	170.00

MICRONUTRIENTES	
ELEMENTO	CONCENTRACIÓN (mg/l)
MnSO ₄ .H ₂ O	22.30
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60
H ₃ BO ₃	6.20
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.02
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.02

VITAMINAS	
ELEMENTO	CONCENTRACIÓN (mg/l)
Tiamina HCl	0.10
Myo-inositol	100.00

FUENTE DE ENERGÍA	
ELEMENTO	CONCENTRACIÓN (g/l)
SACAROSA	30.00

Anexo 2. Protocolo de desinfección y siembra de explantes de plátano para iniciar la fase de establecimiento

1. Recolectar hijos espada (cormos) de plantas madres seleccionadas de un lote de multiplicación sano sin signos aparentes de problemas sanitarios.
2. Limpieza de los cormos seleccionados con la ayuda de una navaja afilada.
3. Eliminar las partes externas y vainas foliares del cormo hasta obtener secciones de 3cm de base y 5cm de altura.
4. Colocar los cormos en un vaso de precipitación de 1000ml donde se lavaron con jabón líquido por 5 minutos y se procedió a enjuagar con abundante agua corriente.
5. Colocar en un nuevo vaso de precipitación los cormos para ser llevado a condiciones de asepsia (cámara de flujo laminar) para la desinfección.
6. Colocar en frascos esterilizados las secciones de plátano para desinfectarlos utilizando 1.1. ppm de NaOCl (hipoclorito de sodio al 5.25%) y gotas de Tween-20 colocados en agua esterilizada durante 20 minutos, totalmente sellados.
7. Enjuagar luego de los 20 minutos por cuatro ocasiones con agua esterilizada, dejándolos reposar en el mismo frasco hasta el momento de sacarlos individualmente para continuar reduciéndolos.
8. Proceder con ayuda de hojas estériles de bisturí a eliminar las partes externas del explante con la finalidad de reducir el tamaño de los explantes, hasta alcanzar una altura de 2cm y 1,5cm en la base.
9. Colocar inmediatamente luego de reducirlos, en una solución antioxidante de cisteína (50 mg/l.), hasta el momento de la siembra.
10. Sembrar los explantes dentro de los tubos o vasos conteniendo el medio de cultivo previamente dispensados.

Anexo 3

Tabla 4. ANOVA realizado para evaluar la longitud de los brotes en cvs.. Barraganete y Curaré, durante la fase de multiplicación.

PRUEBAS DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS						
Variable dependiente: Longitud de brotes						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Significancia
Modelo corregido	4,418 ^a	13	,340	6,670	,000	
Intersección	324,815	1	324,815	6374,879	,000	
Materiales (A)	,001	1	,001	,019	,892	NS
Dosis (B)	3,878	6	,646	12,685	,000	**
Interacción (A*B)	,539	6	,090	1,763	,143	NS
Error	1,427	28	,051			
Total	330,660	42				
Total corregida	5,845	41				
a. R cuadrado = ,756 (R cuadrado corregida = ,643)						

Anexo 4. Prueba de comparación de medias de Tukey (diferencia mínima significativa) para la variable de longitud de brotes en cvs.. Barraganete y Curaré en los diferentes tratamientos de la fase de multiplicación

LONGITUD DE BROTES				
DHS de Tukey ^{a,b}				
Dosis de Hormona	N	Subconjunto		
		1	2	3
0	6	2,23c		
6	6	2,46c	2,46b	
5	6	2,71c	2,71b	2,71a
4	6		2,91b	2,91 a
3	6		2,95b	2,95 a
2	6			3,05 a
1	6			3,13 a
Sig.		,014	,014	,047
Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.				
Basadas en las medias observadas.				
El término de error es la media cuadrática(Error) = ,051.				
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000				
b. Alfa = ,01.				

Anexo 5.

Tabla 5. ANOVA realizado para evaluar el diámetro de los brotes en cvs. Barraganete y Curaré en el tercer subcultivo de los tratamientos durante la fase de establecimiento.

PRUEBAS DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS						
Variable dependiente: Diámetro de Brotes						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Significancia
Modelo corregido	16,117 ^a	13	1,240	10,131	,000	
Intersección	602,686	1	602,686	4924,671	,000	
Materiales (A)	3,372	1	3,372	27,551	,000	**
Dosis (B)	10,062	6	1,677	13,704	,000	**
Interacción (A*B)	2,683	6	,447	3,654	,008	*
Error	3,427	28	,122			
Total corregida	19,544	41				
a. R cuadrado = ,825 (R cuadrado corregida = ,743)						

Anexo 7. Prueba de comparación de medias de Tukey (diferencia mínima significativa) para la variable de diámetro de los brotes en cvs.. Barraganete y Curaré en los diferentes tratamientos de la fase de multiplicación.

DIÁMETRO DE BROTES					
DHS de Tukey ^{a,b}					
Tratamientos	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
P1T0	3	2,43d			
P2T0	3	3,10d	3,10c		
P1T2	3	3,23d	3,23c		
P2T1	3	3,46d	3,46c	3,46b	
P1T6	3	3,50d	3,50c	3,50b	3,50 a
P1T3	3	3,63d	3,63c	3,63b	3,63 a
P1T1	3		3,70c	3,70b	3,70 a
P2T4	3		3,93c	3,93b	3,93 a
P2T2	3		3,96c	3,96b	3,96 a
P1T5	3		4,00c	4,00b	4,00 a
P1T4	3		4,03c	4,03b	4,03 a
P2T5	3			4,63b	4,63 a
P2T3	3			4,66b	4,66 a
P2 T6	3				4,73 a
Sig.		,014	,117	,014	,010
Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.					
Basadas en las medias observadas.					
El término de error es la media cuadrática(Error) = ,122.					
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000					
b. Alfa = ,01.					

Anexo 8

Tabla 6. ANOVA realizado para evaluar el número promedio de brotes/explante en cvs. Barraganete y Curaré durante la fase de multiplicación.

PRUEBAS DE LOS EFECTOS INTER-SUJETOS						
Variable dependiente: Numero de Brotes						
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Significancia
Modelo corregido	14,158 ^a	13	1,089	34,486	,000	
Intersección	324,370	1	324,370	10271,078	,000	
Materiales (A)	,052	1	,052	1,651	,209	NS
Dosis (B)	12,593	6	2,099	66,458	,000	**
Interacción (A*B)	1,513	6	,252	7,986	,000	**
Error	,884	28	,032			
Total corregida	15,043	41				
a. R cuadrado = ,941 (R cuadrado corregida = ,914)						

Anexo 9. Prueba de comparación de medias de Tukey (diferencia mínima significativa) para la variable de número promedio de brotes/explante en cvs.. Barraganete y Curaré en los diferentes tratamientos de la fase de multiplicación.

DHS de Tukey ^{a,b}								
Tratamientos	N	Subconjunto						
		1	2	3	4	5	6	7
P2T0	3	1,90g						
P1T0	3	2,03g	2,03f					
P2T5	3	2,30g	2,30f	2,30e				
P1T4	3	2,32g	2,32f	2,32e				
P2T6	3	2,36g	2,36f	2,36e				
P1T5	3		2,53f	2,53e	2,53d			
P2T4	3		2,56f	2,56e	2,56d	2,56c		
P1T6	3			2,66e	2,66d	2,66c		
P1T1	3				3,03d	3,03c	3,03b	
P1T3	3				3,09d	3,09c	3,09b	
P2T3	3					3,16c	3,16b	
P2T2	3						3,46b	3,46 a
P1T2	3						3,52b	3,52 a
P2T1	3							3,93 a
Sig.		,129	,048	,426	,030	,016	,093	,129
Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.								
Basadas en las medias observadas.								
El término de error es la media cuadrática(Error) = ,032.								
a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000								
b. Alfa = ,01.								

Anexo 10

Cuadro 2. Equipos, materiales, reactivo y otros utilizados durante el ensayo

RUBRO	FASE DE DESINFECCIÓN	FASE DE ESTABLECIMIENTO	FASE DE MULTIPLICACIÓN
EQUIPOS			
Cámara de flujo laminar		x	x
Autoclave		x	x
Destilador de agua		x	x
Refrigerador		x	x
Peachimetro		x	x
Balanza analítica		x	x
MATERIALES			
Tubos de ensayo		x	
Vasos de polipropileno			x
Vaso de precipitación		x	x
Pinzas		x	x
Erlenmeyer		x	x
Mechero		x	x
Piseta		x	x
Goteros		x	x
Materiales de vidrio y plástico	x	x	x
REACTIVOS			
Sacarosa		x	x
Vitaminas		x	x
Solución Murashige y Skoog		x	x
Reguladores de crecimiento			x
Soluciones buffer		x	x
Gellan Gum		x	x
Hidróxido de sodio			
Ácido clorhídrico			
OTROS			
Hipoclorito de sodio (Cloro comercial)	x		
Alcohol potable 70 y 90°		x	x
Tween-20	x	x	
Jabón líquido	x		
Gorros, guantes, botas, mascarillas, tapa bocas		x	x
Bisturí		x	x
Papel Kraf		x	X
Calibrador pie de rey		x	x
Marcador		x	x
Cinta parafilm		x	x
Papel aluminio		x	x
Navaja	x		

