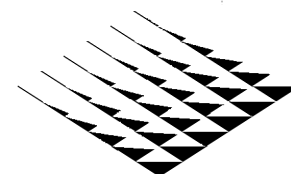


**Micropropagación de plátano (*Musa AAB*, cv  
curraré ) en un medio con sustitución de  
insumos**

**Informe presentado a la  
Escuela de Agronomía del  
Instituto Tecnológico de  
Costa Rica como requisito  
parcial para optar el título  
de Ingeniero Agrónomo  
con grado de bachiller**

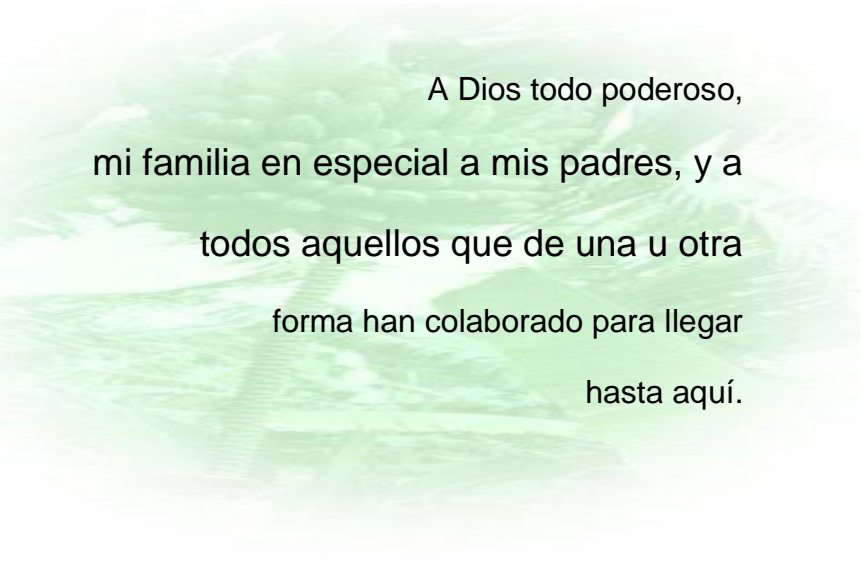
**ADRIÁN JIMÉNEZ ZÚÑIGA**

**SEDE REGIONAL SAN CARLOS  
2004**



**SSC-TEC**  
Sede San Carlos  
Instituto Tecnológico de Costa Rica

## DEDICATORIA



A Dios todo poderoso,  
mi familia en especial a mis padres, y a  
todos aquellos que de una u otra  
forma han colaborado para llegar  
hasta aquí.

## AGRADECIMIENTO

A todo el personal del Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales, al jurado evaluador, al personal docente del Instituto Tecnológico, Sede San Carlos.

A mis compañeros de estudio durante estos años de carrera, a la familia Pérez González. A mis familiares y amigos, a mi novia. Y todas aquellas personas que de alguna forma han estado a mi lado durante este periodo de vida tan importante para mí.

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>ii</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>iii</b>
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>vii</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos .....	4
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
3.1 Cultivo del plátano.....	5
3.1.1 Descripción taxonómica.....	5
3.1.2 Caracterización botánica.....	5
3.1.3 Ecología del plátano.....	7
3.2 Micropropagación de musáceas.....	8
3.2.1 Historia.....	8
3.2.2 Etapas de la micropropagación en musáceas .....	9
3.2.3 Ventajas y desventajas de la micropropagación .....	13
3.3 Medios de cultivo para la micropropagación: componentes principales y alternativos.....	15
3.3.1 Sales minerales.....	16
3.3.2 Vitaminas .....	22
3.3.3 Sacarosa .....	25
3.3.4 Reguladores de crecimiento.....	26
3.3.5 Gelificantes .....	29
3.3.6 Agua.....	33
3.3.7 Otros componentes.....	34
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1 Ubicación del estudio.....	35

4.2	Material experimental .....	35
4.3	Tratamientos y análisis de datos .....	36
4.3.1	Tratamientos evaluados .....	36
4.3.2	Modelo estadístico .....	38
4.3.3	Análisis de datos .....	38
4.4	Variables evaluadas .....	38
4.4.1	Porcentaje de supervivencia.....	38
4.4.2	Número de brotes.....	39
4.4.3	Longitud de los brotes.....	39
4.4.4	Número de raíces .....	39
4.4.5	Longitud de raíces.....	39
4.4.6	Número de rojas.....	39
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>40</b>
5.1	Porcentaje de supervivencia.....	40
5.2	Número de brotes.....	41
5.3	Longitud de los brotes.....	45
5.4	Número de raíces .....	47
5.5	Longitud de las raíces .....	47
5.6	Número de hojas .....	48
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>54</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Medios de cultivo utilizados en las diferentes etapas de micropropagación de musáceas .....	11
Cuadro 2. Comparación entre la concentración de sales minerales según Murashige & Skoog y soluciones nutritivas para cultivos hidropónicos marca INDAGRO® (mg l <sup>-1</sup> de medio).....	22
Cuadro 3. Comparación entre la concentración de vitaminas según Murashige & Skoog y tabletas para consumo humano marca Neurobine® (mg l <sup>-1</sup> de medio).....	25
Cuadro 4. Carbohidratos utilizados para el cultivo <i>in vitro</i> de plantas.....	26
Cuadro 5. Concentración de minerales en algunos agentes gelificantes ..	30
Cuadro 6. Descripción de los principales productos usados como gelificantes.....	31
Cuadro 7. Polímeros utilizados para solidificar medios de cultivo.....	32
Cuadro 8. Tratamientos para estudiar el efecto de la sustitución de insumos para la micropropagación de plátano ( <i>Musa AAB</i> cv Curraré ), Laboratorio de Biotecnología de Cultivos Tropicales, del ITCR, SSC, 2003.....	37
Cuadro 1A. Resultados de la Prueba T de grupos independientes para las variables: número de brotes, longitud de brotes, número de raíces, longitud de raíces, número de hojas y porcentaje de supervivencia.....	57
Cuadro 2B. Comparación del precio de los componentes del medio de cultivo convencional y con sustitución de insumos (US \$), al cabo de ocho semanas de micropropagación.....	58

## LISTA DE FIGURAS

---

	Página
Figura 1. Corno de plátano, listo para obtener el ápice vegetativo .....	10
Figura 2. Material experimental. A) Plantas madre <i>in vitro</i> donantes de los explantes iniciales . B) Explantes iniciales.....	35
Figura 3. Fuentes de sales minerales, gelificante y vitaminas utilizados en la elaboración del medio con sustitución de insumos .....	36
Figura 4. Número de explantes muertos (acumulados) en el medio convencional y en el de sustitución de insumos, contabilizados durante las ocho semanas de evaluación.....	40
Figura 5. Número de brotes promedio para el medio convencional y en el medio con sustitución de insumos, contabilizados al cabo de ocho semanas.....	42
Figura 7. Longitud media de los brotes desarrollados, en un medio convencional y un medio con sustitución de insumos al cabo de ocho semanas de evaluación .....	45
Figura 8. Número medio hojas emergidas, en un medio convencional y un medio con sustitución de insumos al cabo de ocho semanas de evaluación .....	49

## RESUMEN

Esta investigación tuvo por objetivo principal la evaluación de la respuestas morfogénicas de microcormos de plátano (*Musa AAB*, cv Curraré) a un medio de cultivo con sustitución de insumos. Para ello se evaluaron dos medio; el primero es de uso convencional en la propagación in vitro , y segundo con sustitución de ciertos insumos (sales minerales, vitaminas y gelificante) los cuales son de bajo costo.

Se evaluó el porcentaje de supervivencia, número de brotes, longitud de brotes, número de raíces, longitud de raíces y número de hojas. Al cabo de ocho semanas de evaluación se obtuvo que: el número de brotes fue de  $6,1 \pm 1,54$  para el medio convencional y  $3,38 \pm 0,77$  para el medio con sustitución de insumos, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Resultados similares se encontraron al evaluar la longitud de los brotes y número de hojas, en donde se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). Para el primer caso de la primer variable, se obtuvo un valor medio de  $20,02 \pm 4$  mm en el medio convencional y  $12,39 \pm 1$  mm en el de sustitución de insumos. El número de hojas fue de  $15,63 \pm 2,75$  para el medio convencional y  $6,97 \pm 1,55$  en el medio con sustitución de insumos.

En el caso de las variables número de raíces y su longitud, así como porcentaje de supervivencia; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ). Para la primer variable mencionada; se contabilizaron  $1,93 \pm 1,33$  raíces en el medio convencional y  $1,14 \pm 2,2$  raíces en el de sustitución de insumos. La longitud de las raíces, fue de  $8,50 \pm 1,32$  mm y  $7,92 \pm 1,63$  mm, en el medio convencional y de sustitución de insumos respectivamente. En el caso del porcentaje de supervivencia, fue de 73,08% para el medio convencional y de 69,23 % para el medio con sustitución de insumos.

Las diferencias encontradas para las variables número de brotes, longitud de los brotes y número de hojas; puede ser causada por baja concentración de minerales esenciales como nitrógeno, zinc y hierro; y a la elevada concentración de otros como el cobre y fósforo, en el medio con sustitución de insumos.

Se concluye que el medio convencional, permitió una brotación y emergencia de hojas mayor. Sin embargo, no existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en cuanto a regeneración y desarrollo de raíces, así como en el porcentaje de supervivencia.



## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo del banano, ha formado parte de la economía y cultura de la mayoría de países tropicales alrededor del mundo, esto especialmente desde el siglo XIX, influyendo de sobremanera en las economías y desarrollo social de muchas zonas geográficas incluido nuestro país (Soto, 1992).

El banano ha sido durante muchos años pilar fundamental dentro de la economía nacional; sin embargo en los últimos tiempos por condiciones del mercado internacional, éste junto con otros productos llamados tradicionales han venido perdiendo terreno en cuanto a exportaciones y aporte al producto interno bruto nacional. Por lo cual se debe promover el desarrollo de otros productos agrícolas como una táctica tendiente a diversificar la producción. Es ahí en donde han tomado importancia los productos o cultivos llamados no tradicionales, al punto que para el 2001 igualaron en valor de aporte de las exportaciones a los tradicionales (SEPSA, 2003).

Dentro de estos productos se ubica al plátano, el cual se ha convertido en una opción de exportación para los pequeños productores de la Zona Norte y Atlántica de Costa Rica. Se estima que actualmente existen alrededor de 8 900 hectáreas sembradas en nuestro territorio (SEPSA, 2003) con un comportamiento creciente año tras año. Así pues, dicho producto ha logrado aportar a nuestra economía hasta \$ 19 millones por año para 1997 (SEPSA, 2003).

Sin embargo, las técnicas de producción utilizadas por los agricultores, es de tipo tradicional <sup>1</sup>, restringiendo la productividad de este cultivo. El proceso de establecimiento y renovación de las plantaciones, es un aspecto deficiente dentro del proceso productivo, ya que la semilla utilizada procede de técnicas poco eficientes, desde el punto de vista productivo y sanitario<sup>2</sup>.

Dentro de la biotecnología, existen técnicas que se podrían utilizar para solucionar algunos de este problema. Al ser una herramienta utilizable en áreas

---

<sup>1,2</sup> Palma, T. 2003. San Carlos, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

como la propagación masiva por medio del cultivo de tejidos, la cual surge como una alternativa, que permite por medio de técnicas de micropropagación la generación de plantas que han demostrado ser muy vigorosas, requieren menos insumos e incluso la producción podría certificarse como producto orgánico, que le dan mayor competitividad en los mercados internacionales (Sandoval, 2001). Sin embargo, la micropropagación presenta su mayor inconveniente en los costos un tanto elevados para el pequeño y mediano productor<sup>3</sup>.

Es por eso que se hace necesario, investigar nuevas técnicas de propagación que permita de alguna forma, hacer mucho mas eficiente este proceso. Es así como surge la necesidad de investigar nuevas alternativas que permitan abaratar los costos de producción de vitroplantas, sin disminuir la calidad de las mismas.

Es ahí en donde se justifica investigaciones como esta, la cual tiene como finalidad primordial evaluar las respuestas morfogénicas de microcormos de plátano (*Musa AAB*, cv Curraré) en un medio de cultivo con sustitución de insumos, que permita al Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos ofrecer semilla de calidad y de bajo costo, siendo accesibles para pequeños y medianos productores de la Región Huetar Norte, contribuyendo en el beneficio económico y social de la zona.

La investigación en técnicas de micropropagación masiva de bajo costo en Costa Rica es aún muy incipiente, excepto por algunos trabajos desarrollados en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales de la Escuela de Agronomía, en cultivos como ñampí (*Colocasia sculenta*), vainilla (*Vanilla paniflora*), jengibre (*Zingiber officinale*), yuca (*Manihot sculenta*), raicilla (*Psychotria ipecacuanha*) y diversas especies de orquídeas, en los cuales se emplearon sales minerales utilizadas originalmente en cultivos hidropónicos, vitaminas destinadas al consumo humano, agua de coco, y gelificando los

---

<sup>3</sup> Palma, T. 2003. San Carlos, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

medios de cultivo con almidón de maíz o con gelatina blanca, lo que permite disminuir el costo de una planta en más de un 20% (Palma y Montero, 2002).

Se sustituyeron tres insumos presentes en los medios de cultivo utilizados convencionalmente en la micropropagación de plantas de plátano (*Musa AAB*, cv Curaré): el gelificante, sales minerales y vitaminas, cuyas fuentes generalmente son proporcionados por empresas productoras de químicos como SIGMA<sup>®</sup>, MERK<sup>®</sup> O DIFCO<sup>®</sup>, que serán sustituidos por otras fuentes de menor costo como fertilizantes preparados por la empresa INDAGRO<sup>®</sup> para cultivos en sustrato hidropónico, vitaminas de consumo humano producidas por MEPHA<sup>®</sup> y almidón de maíz elaborado por MAIZENA<sup>®</sup>.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Evaluar las respuestas morfogénicas de brotes de plátano (*Musa AAB*, cv Curraré) en un medio con sustitución de insumos.

### 2.2 Objetivos específicos

- a. Cuantificar el número de brotes y su longitud como respuesta a dos medios de cultivo (el convencional y con sustitución de insumos).
- b. Determinar el porcentaje de supervivencia durante el periodo de propagación de plátano (*Musa AAB*, cv Curraré) en un medio convencional y otro con sustitución de insumos .
- c. Cuantificar el número de hojas en brotes de plátano (*Musa AAB*, cv Curraré), regeneradas *in vitro* en un medio convencional y en otro con sustitución de insumos.
- d. Cuantificar el número de raíces así como su longitud, a partir de microcormos de plátano (*Musa AAB*, cv Curraré) propagadas en dos medios de cultivo; uno el convencional y otro con sustitución de insumos.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1 Cultivo del plátano

##### 3.1.1 Descripción taxonómica

Las musáceas pertenecen a la clase de las monocotiledóneas, al orden Zingiberales y a la familia Musaceae, la cual incluye a los géneros Musa y Ensete. El género se divide en cuatro secciones: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys y Emusa. Esta última sección comprende a las especies M. acuminata y M. balbisiana. El número básico cromosómico para la sección Eumusa es de  $n = 11$ . Las musáceas comestibles usualmente se dividen en dos tipos: especies M. acuminata y M. balbisiana que son diploides (Simmonds, mencionado por Soto, 1992).

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 identificación de cultivares (Aguilar, 1993).

El grupo AAA está constituido por varios tipos de bananos con alguna semejanza entre si (Soto, 1992). La separación de éstos, requiere de la aplicación de una clave de cinco puntos y quince descriptores morfológicos descrita por Simmonds (Soto, 1992).

##### 3.1.2 Caracterización botánica

En general, se puede decir que los plátanos son plantas herbáceas con seudotallos aéreos que se originan de cormos carnosos en los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales (hijos). Las hojas tienen una distribución helicoidal. La inflorescencia es terminal y crece a través del centro del seudotallo hasta alcanzar la superficie (Soto, 1992).

### 3.1.2.1 Sistema Radical

Las raíces salen de la parte superior del cormo, inmediatamente debajo de la inserción de las hojas y su número disminuye hacia la parte inferior, las raíces superiores pueden llegar a alcanzar hasta 4 m de largo y se extienden en sentido horizontal, mientras que las inferiores pueden llegar a profundizar hasta 1.30 m. La diferenciación de raíces se detiene inmediatamente después de la parición (Champion, citado por Aguilar 1993). En la planta de banano, las raíces poseen forma de cordón y aparecen en grupos de 3 a 4; el diámetro oscila en 5 y 10 mm (Beugnan y Champion, citados por Aguilar 1993)

### 3.1.2.2 Cormo

Soto (1992) describe al cormo como un tallo que desarrolla hojas en la parte superior y raíces adventicias en la parte inferior. En su región externa está formado por entrenudos cortos, marcados por cicatrices de las hojas ya muertas. En la parte superior, está el punto de crecimiento que da origen a las hojas (Aguilar, 1993).

### 3.1.2.3 Seudotallo

Elseudotallo del plátano está constituido por las vainas envolventes de las hojas que se disponen en forma helicoidal, unidas fuertemente unas con otras permitiendo mantener la planta en posición (Pardo, citado por Aguilar 1993).

### 3.1.2.4 Tallo Floral

El tallo floral de las musáceas es visible hasta el momento de la parición ya que se desarrolla intermitentemente a través delseudotallo, terminando en la inflorescencia ( León, citado por Aguilar 1993).

### 3.1.2.5 Hojas

Las musáceas presentan tres tipos de hojas: rudimentarias, estrechas ensiformes y hojas anchas o verdaderas. La hoja verdadera presenta cinco partes, vaina, peciolo, nervadura central, lámina y el apéndice (Krigesvould, citado por Aguilar 1993).

### 3.1.2.6 Inflorescencia

La inflorescencia constituye en la mayoría de las musáceas, es la continuación del tallo floral, en este las hojas están reemplazadas por brácteas que cubren las flores (León y Mora, citados por Aguilar 1993).

### 3.1.2.7 Yemas Laterales

Las yemas laterales se desarrollan a partir de las yemas laterales del cormo (Soto, 1992). Estas, se encuentran íntimamente relacionadas con el desarrollo de la madre, ya que es la que controla la dominancia apical de la “cepa”, es decir, que las yemas laterales o “hijos inician su desarrollo hasta que la madre lo “indique”. Según Soto (1992) la independencia del “hijo” ocurre cuando después de desarrollar 7 a 12 hojas muy reducidas, da origen a una hoja con una lámina foliar cuyo ancho es cercano a los 10 cm (denominada F10).

## 3.1.3 Ecología del plátano

En general se puede decir que el cultivo del plátano solo se puede dar en condiciones tropicales y subtropicales es decir, lugares donde las precipitaciones son altas y continuas durante casi todo el año (superior a 2000 mm), aunque no soporta en grandes cantidades la humedad en el suelo, pero si en el ambiente. Las condiciones de ventosidad deben ser reducidas, ya que genera volcamiento y por ende pérdidas económicas (Soto, 1992).

En lo que respecta al suelo, este debe de ser alto en materia orgánica, de textura franca y bien drenado, ya que su sistema radical no tolera la falta de aireación.

Soporta un límite de altitud de 300 m.s.n.m. (Aubert, citado por Soto 1992). No se desarrolla bajo temperaturas de 15 grados centígrados (Soto, 1992).

### **3.2 Micropropagación de musáceas**

La biotecnología es un término muy utilizado en la actualidad, esto debido al auge que ha recibido a finales del siglo anterior y principios de este la genética y biología. Esta puede ser definida como “un conjunto de técnicas que permite la utilización de los seres vivos con propósitos industriales y comerciales” (Sandoval, 2001).

De la biotecnología se derivan una serie de áreas de estudio, dentro de las cuales se tiene la micropropagación, ésta consiste en cultivar pequeños segmentos de la planta (explantes), células en suspensión y protoplastos<sup>4</sup> sobre medios sintéticos y en condiciones controladas con el propósito de regenerar órganos o plantas enteras (Navarro, citado por Sandoval 2001).

Esta técnica ha tenido mucho auge en una serie de cultivos a nivel mundial, a tal grado que se ha convertido prácticamente en el único medio de propagación vegetativa para éstos. Especialmente en cultivos de reproducción asexual, caso particular del plátano; el cual por su forma de reproducción (por medio de cormos) genera una serie de problemas de tipo sanitario, manejo y productivo, afectando claramente las producciones comerciales.

Es hasta finales de los años setentas cuando se introduce esta nueva técnica de propagación, teniendo su mayor desarrollo hasta los ochentas llegando en estos momentos a tener cultivadas 50 millones de plantas en todo el mundo (Sandoval, 2001).

#### **3.2.1 Historia**

La micropropagación de musáceas dio inicio con el banano, inicialmente establecida y puesta en práctica en el laboratorio de biotecnología del

---

<sup>4</sup> Palma, T. 2003. San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica.



Departamento de Horticultura de la Universidad de Taiwán en 1972 por Ma y Shii (Sandoval, 2001).

En Costa Rica fue conocida hasta el año de 1985, por medio de las primeras investigaciones llevadas a cabo por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza).

Ya para el año 1986 empieza a funcionar el primer laboratorio privado de producción masiva con el nombre de Agribiotecnología de Costa Rica S.A estableciéndose ese mismo año un convenio entre esta empresa y ASBANA (Asociación Bananera Nacional), por medio del cual ASBANA adquiere 20 mil plantas para trabajos investigativos (ASBANA, 1986).

Para el año 1992 CORBANA establece su propio Laboratorio de Cultivo de Tejidos con el cual se fortalece la investigación en este cultivo (Sandoval, 2001).

### 3.2.2 Etapas de la micropropagación en musáceas

#### 3.2.2.1 Selección y preparación del material

El proceso de micropropagación inicia en el campo seleccionándose las plantas madre, las cuales son hijuelos que deben cumplir ciertas características como: vigor de crecimiento, características del fruto, sanidad y su apariencia (Israeli *et al.*, 1995), además deben poseer una altura entre 0,5 y 0,7 m (Sandoval, 2001).

Este material seleccionado (ver figura 1), es transportado hasta el laboratorio en donde se le quitan las partes externas del cormo y las vainas foliares hasta obtener secciones de 5 cm de largo y de diámetro, que encierran al ápice vegetativo (Sandoval, 2001).

Una vez obtenida esta sección, se somete a un proceso de desinfección, con el fin de eliminar patógenos endógenos y exógenos a la planta. Este protocolo de desinfección varía de un laboratorio a otro.



**Figura 1.** Corno de plátano, listo para obtener el ápice vegetativo

En el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales, el material que viene del campo se somete a dos procesos de desinfección; uno que elimina la mayor parte de los microorganismos patógenos presentes en la superficie de los tejidos vegetales y otra desinfección superficial mas profunda, con el fin de eliminar todo tipo de contaminante que pueda prevalecer en los espacios intercelulares (Palma y Montero, 2002).

La desinfección consiste en colocar los explantes en una disolución de jabón y agua por 10 minutos, luego se colocan en una disolución de KILOL LDF-100 11SL<sup>®</sup> (1,5 mg l<sup>-1</sup>), el cual funciona como un bactericida y fungicida. La mezcla (explantes y disolución) se coloca en un limpiador ultrasónico por un lapso de 5 minutos y 5 minutos fuera de este, por último los explantes son colocados en hipoclorito de sodio al 1.5% durante 5 minutos en el terapiador ultrasónico y otros 5 minutos fuera de el (Palma, 1998).

Una vez realizada la desinfección el meristemo debe ser colocado en una solución acuosa estéril de ácido ascórbico (1 mg ml<sup>-1</sup>) o ácido cítrico (1mg ml<sup>-1</sup>) durante 10 minutos, para evitar al máximo el proceso de oxidación provocado por diversos fenoles que se encuentran en la mayoría de musáceas (Sandoval, 2001).

Con el procedimiento anterior, los ápices están prácticamente listos para ser colocados en el medio de cultivo de introducción (ver cuadro 1). En la

cámara de flujo laminar los ápices son sometidos a un proceso de enjuague con agua destilada (antes de ser colocados en la solución antioxidante). En el momento de ser sembrada, el tamaño del explante es reducido hasta quedar en 0.5 o 0.6 mm (Sandoval, 2001).

### 3.2.2.2 Establecimiento

La fase de establecimiento consta de 30 días, tiempo durante el cual los explantes permanecen en un medio de introducción (ver cuadro 1), el cual permanece en un medio ambiente cuyas condiciones deben de ser controladas. Angarita y Perea (1995) recomiendan condiciones de 16 horas luz, 30 grados centígrados. Además de una humedad relativa del 60-70% (Israeli *et al.*, 1995).

En esta etapa es importante tener en cuenta el nivel de incidencia de contaminación, la cual se puede deber a contaminación del medio ambiente o presencia de algún tipo de bacteria endógena, para Sandoval (2001) durante esta etapa el grado de contaminación no debe exceder el 5%.

**Cuadro 1.** Medios de cultivo utilizados en las diferentes etapas de micropropagación de musáceas

	Introducción	Multipliación	Enraizamiento
Macroelementos	MS(1962)	MS(1962)	MS(1962)
Microelementos	MS(1962)	MS(1962)	MS(1962)
Vitaminas	MS(1962)	MS(1962)	MS(1962)
BA o BAP	3 mg/l	3 mg/l	
Sacarosa	30 g/l	30 g/l	30 g/l
pH	5.7	5.7	5.7
Agar-Agar	5.5 g/l	5.5 g/l	5.5 g/l

**Fuente.** Palma y Montero (2002).

### 3.2.2.3 Multiplicación o Propagación

Al cabo de los 30 días, los explantes (que ya para ese momento deben tener apariencia de planta) son extraídos del medio inicial y se les coloca en un medio nuevo e igual al anterior, a excepción de la cantidad de fitohormona (ver cuadro 1). Para tal efecto, se toma el ápice y con el bisturí se le hace un corte longitudinal, lo mas centrado posible, con la finalidad de herir el meristemo y evitar la dominancia apical (Sandoval, 2001). Sin embargo, otros autores recomiendan no realizar esta práctica ya que la incidencia de oxidación es muy alta, o de realizarse esta técnica se recomienda la introducción de los brotes seccionados en una solución de antioxidante, a una concentración de  $1,5 \text{ mg l}^{-1}$  (Palma y Montero, 2002).

El período de formación de yemas laterales para nuevos explantes es de 60 días, esperando que al cabo de este período cada sección del brote seccionado genere un número mínimo de tres brotes (Sandoval, 2001).

Hay que recalcar que la proliferación y multiplicación dependen de muchos factores como el genotipo, composición del medio de cultivo, tamaño inicial del explante, procedimiento y edad del cultivo (Vuylsteke, citado por Sandoval 2001).

### 3.2.2.4 Formación de Raíces

Los brotes que presenten un tamaño aproximado de 1 a 1.5 cm son separados individualmente y se colocan en un medio que permita la obtención de plantas completas (Sandoval, 2001). Se espera que después de 30 días en el medio de cultivo la plántula presentará un adecuado sistema radical y follaje, tiempo para el cual se espera que pueda ser transplantada a suelo para ser aclimatada (Sandoval, 1986).

### 3.2.2.5 Aclimatación

La etapa de aclimatación o endurecimiento es quizás una de las etapas más importantes de todo el proceso de micropropagación, ya que significa un período en donde la planta se ve sometida a un gran “stress” debido al cambio que involucra. Sin embargo, en la mayoría de los casos no recibe la importancia

debida. Esta importancia radica en el hecho de que el número de plantas que se obtenga en este proceso será el definitivo y el que irá en definitiva al campo (Sandoval, 2001).

El estrés sufrido por las plantas en la etapa de aclimatación, es causado por la susceptibilidad de las mismas, ya que éstas provienen de un medio en donde no están expuestas a la presión de patógenos, además la humedad relativa del cultivo *in vitro* es bastante alta, pasando luego a otras condiciones de menor humedad, pudiendo generarse deshidratación. Pero quizás el mayor cambio se debe a que la planta en condiciones *in vitro* es heterótrofa, por lo que al pasar a un medio *ex vitro* esta debe aprender a obtener los nutrientes del medio.

El ambiente que se les debe proveer debe constar de un suelo con textura franca y esterilizado, preferiblemente proveniente de lugares libres de plantas pertenecientes a la familia Musaceae. Inicialmente requieren de una humedad relativa alta y un 75% de sombra (Sandoval, 2001).

Según Israeli *et al.*, (1995 ) las plántulas deben tener al final de esta etapa de 4 a 5 cm, 4 a 5 hojas, un seudotallo con una base que mida entre 4 y 5 cm y un buen sistema radicular.

### 3.2.3 Ventajas y desventajas de la micropropagación

#### 3.2.3.1 Ventajas

- Con la técnica de la micropropagación partiendo de ápices se prevee actualmente la obtención potencial hasta de 15 millones de plántulas por ápice al año (Angarita y Perea, citados por Sandoval 1986), sin embargo algunos investigadores como Sandoval (2001) no son tan optimistas, aunque si aseguran que pueda alcanzar la meta de 1 millón de plantas.

- Con la propagación *in vitro* se asegura la producción de poblaciones homogéneas tanto en número, como en vigor; con lo cual se asegura plantaciones también homogéneas desde el punto de vista productivo, lo que

permite al productor planificar de mejor forma tanto la siembra como la producción.

- La precocidad y alta producción es una característica que recalcan diversos autores sobre las plantas obtenidas de propagación *in vitro*.
- Kwa y Ganry (citado por Sandoval, 2001) han reportado que plantaciones obtenidas a través de la micropropagación producen hasta un 55% más que una convencional, además de producir racimos más pesados y de alta calidad.
- Es un hecho que las plantas producidas de forma *in vitro* sufren de una menor incidencia de plagas, con lo que se disminuye la utilización de algunos agroquímicos como nematicidas, colaborando en la conservación del medio ambiente.
- Sandoval (2001) además afirma que por medio de esta técnica se agiliza la conservación y el intercambio internacional de germoplasma.

#### 3.2.3.2 Desventajas

- La variación somaclonal es la más importante limitación de la micropropagación en musáceas (Israeli, *et al.*, 1995), la cual consiste en variaciones de plantas que se encuentran fuera de tipo (Aguilar, 1993) generando producciones irregulares.
- La necesidad de adquirir tecnología especializada y personal capacitado, genera un elevado costo de producción, provocando que las plantas destinadas a la venta tengan un alto valor económico.
- Uno de los mayores riesgos que se corre con esta práctica es la de propagar enfermedades de tipo vascular como el moko y mal de Panamá (Angalita y Perea, 1990).

### **3.3 Medios de cultivo para la micropropagación: componentes principales y alternativos**

Quizás los primeros medios de cultivo para plantas fueron las soluciones nutritivas o extractos de frutas, utilizadas para estudiar aspectos fisiológicos relacionados con la nutrición de plantas o para tratar de estudiar el origen biológico de algunos seres vivos. Las cuales fueron desarrollados a principios del siglo pasado por Haberlandt (1902), Gautheret (1934) y White (1934) (Endress, 1994).

Para años posteriores, con el desarrollo de diversas investigaciones en el campo del cultivo de tejidos en plantas, se ve la necesidad de implementar medios que permitan el desarrollo adecuado de las diferentes estructuras vegetativas. Es primer objetivo en la preparación de un medio de cultivo es el suministrar los nutrimentos minerales en concentraciones adecuadas (Roca y Mronginski, 1991). Sin embargo, es sabido también de la necesidad de otros componentes de tipo orgánico (amino ácidos, vitaminas), reguladores de crecimiento y fuentes de carbono (Gamborg *et al.*, Shenk y Hildebrandt; Murashige, citados por Endress 1994) necesarios para el mantenimiento de las funciones vitales del cultivo.

En el caso de la micropropagación de musáceas, generalmente se ha utilizado un medio Murashige y Skoog (Sandoval, 2001), adicionados con vitaminas (myo inositol, tiamina-HCl, piridoxina-HCl, glicina y ácido nicotínico), sacarosa, reguladores de crecimiento (benciladenina) y gelificando generalmente con Agar (Palma y Montero, 2002) (ver cuadro 1). Se pueden encontrar variantes de acuerdo a la etapa de propagación, específicamente para la multiplicación o propagación la principal variante que se encuentra es la elevada cantidad de fitohormona utilizada para promover la proliferación de brotes adventicios (benciladenina a  $3 \text{ mg l}^{-1}$ ), lográndose obtener hasta tres brotes por explante (Sandoval, 2001).

### 3.3.1 Sales minerales

Hacia el final del siglo diecinueve el fisiólogo alemán J. Von Sachs estableció la técnica del cultivo de plantas en agua, ahora llamada hidroponía que eliminó muchas dificultades debidas a las impurezas (Bidwell, 1979).

En 1939 los fisiólogos norteamericanos D. I Arnon y P. R Stout propusieron los siguientes criterios de esencialidad para juzgar el estado exacto de un mineral de nutrición de una planta:

- El elemento debe ser esencial para el crecimiento o reproducción normales, los que no pueden proseguir sin él.
- El elemento no puede ser reemplazado por otro elemento.
- El requerimiento debe ser directo, es decir, que no sea el resultado de algún efecto indirecto como toxicidad relevante, causada por alguna sustancia (Bidwell, 1979).

Como se dijo anteriormente, casi cualquier solución nutritiva posee sales minerales en diversas condiciones, llamadas macro y microelementos.

El término macroelemento incluye elementos como N, S, P, K, Mg, Ca y en algunos casos cloro y sodio, que son agregados en concentraciones no menores a 30 ppm (Endress, 1994). En contraste, los elementos agregados en concentraciones menores a 30 ppm como hierro, boro, manganeso, iodo, molibdeno, zinc son llamados microelementos (Endress, 1994).

#### 3.3.1.1 Macroelementos

No cabe duda sobre la importancia de los elementos mayores en el desarrollo *in vitro* de los diferentes explantes Blazich (mencionado por Seiskandarajah *et al.*, 1990) sugieren que son sumamente importantes en la formación de raíces en muchas especies de plantas, sin embargo, se puede decir que sin éstos el mantenimiento, desarrollo, y proliferación no sería posible. Cada uno de ellos tienen funciones específicas en la micropropagación y el desarrollo de plantas en general.



A continuación se describen las funciones que cada uno de los macroelementos cumplen en las plantas:

a. Calcio (Ca). Es de suma importancia en la síntesis de pectina de la lámina media de la pared celular. También está involucrado en el metabolismo o formación del núcleo y las mitocondrias (Bidwell, 1979). Además, inhibe la síntesis de enzimas relacionadas con el proceso de glucólisis, deposición de fosfolípidos y proteínas dentro o fuera de la membrana plasmática (Endress, 1994).

En la micropropagación se ha logrado demostrar que se puede producir el doble de yemas en embriones de *Daucus carota* bajo concentraciones crecientes de Ca (Jansen *et al.*, citado por Ramaje y Williams, 2002). Dichos autores sugieren que a elevadas concentraciones de este elemento se suprime en buena medida el efecto estimulador del 2,4-D. Hecho parecido fue notado por Tanimoto y Harada (1986) en formación de yemas brotales en *Torenia* por medio de estimulación con citokininas ( Ramaje y Williams, 2002).

Otros autores como Singha *et al.*, (1990) han atribuido la necrosis de las puntas de raíces y problemas de vitrificación a bajas cantidades de Ca en medio de cultivo en plantas de *Cydonia oblonga*. Así pues, estos mismos autores (1990) encontraron una notable reducción en el número de brotes cuando las dosis de Ca rondaron los  $720 \text{ mg l}^{-1}$  (18 mM) para *Cydonia oblonga*.

b. Magnesio (Mg). Este desempeña funciones sumamente importantes en el metabolismo de las plantas. Según Bidwell (1979) el magnesio parece estar implicado en la estabilización de partículas ribosómicas, también puede servir para ligar enzima y substrato, como por ejemplo en reacciones que implican transferencia de fosfato desde el ATP.

c. Potasio (K). Se puede decir que es uno de los elementos más absorbidos por las plantas, aunque según Bidwell (1979) no parece tener función estructural en las plantas, pero desempeña numerosas funciones principalmente catalíticas, que en su mayoría no están claramente definidas.

Autores como Pasqualetto *et al.*, citado por Singha *et al.*, (1990) le han atribuido una relación con la vitrificación cuando su presencia es en bajas concentraciones. Por otro lado, bajas concentraciones en suspensiones celulares de zanahorias silvestres disminuye la formación de embriones somáticos, hecho observado también por Brown *et al.*, citado por Fisichella *et al.*, (2000). Otros autores relacionan la no presencia de K en el medio con una disminución en el crecimiento del explante, menor número de hojas (Lee y De Fossard, citados por Ramaje y Williams 2002).

Aparentemente existe una relación lineal entre la N<sup>6</sup>-benciladenina (BA) suplida y la concentración de K<sup>+</sup> en hojas de tabaco (Ilan, citado por Ramaje y Williams 2002).

d. Nitrógeno (N). Quizás es uno de los elementos más importantes en el funcionamiento de las plantas ya que es un constituyente de proteínas, ácidos nucleicos (Bidwell, 1979).

Generalmente en los diferentes medios de cultivo las fuentes más utilizadas son el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ya sea de forma conjunta o una u otra (Endress, 1994).

Tanto a nivel *ex vitro* como *in vitro* las plantas son muy exigentes de este elemento. Elkonin y Pakhomova (2000) mostraron que los cultivos de tejidos en sorgo, requieren de altas concentraciones de nitrógeno inorgánico, principalmente reducido.

A nivel *in vitro* han sido múltiples los efectos estudiados y descritos por un sin número de autores; en lo que a niveles óptimos y la utilización de una u otra fuente. Daguin y Letouzé citados por Singha *et al.*, (1990) mencionan que altos niveles de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> algunas veces se relacionan con procesos de vitrificación. Se ha descubierto una estrecha relación entre la concentración total de nitrógeno en el medio, así como la proporción entre NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> con el desarrollo de embriones somáticos (Fisichella *et al.*, 2000); además, dichos autores encontraron que una alta regeneración de raíces es obtenida en medios de cultivo con niveles bajos de nitrógeno.

Autores como Fasolo *et al.*, Predieri y Malavasi citados por Seiskandarajah *et al.*, (1990) sugieren que la proporción entre nitrato de amonio y nitrato de potasio influye en la formación de brotes adventicios a partir de hojas de manzana. Tal parece que niveles crecientes de este elemento y algunos amino ácidos, incrementan significativamente la inducción y crecimiento de callos y la habilidad regenerativa (Elkonin y Pakhomova, 2000). Efecto parecido ha sido documentado por Shimasaki y Uemoto (1990), los cuales comprobaron que para la formación adecuada de raíces a partir de rizomas en *Cymbidium*, se necesitan cantidades reducidas de nitrato de amonio y nitrato de potasio.

Como se ha mencionado, el medio que mejor resultado ha brindado en la propagación *in vitro* es el M & S, debido posiblemente a los altos niveles de nitrógeno y potasio, ya que muchos explantes crecen mejor si se les suministra N principalmente reducido como  $\text{NH}_4^+$ , úrea o caseína hidrolizada (Roca, Mroginski, 1991).

La omisión por completo de este elemento en el medio de cultivo causa un detrimento en el crecimiento de los explantes, número de hojas y formación de brotes preformados, aunque este efecto varía de una especie a otra (Lee y De Fossard, citados por Ramaje y Williams 2002).

e. Fósforo (P). Es un nutriente muy importante como parte estructural de muchos compuestos, principalmente ácidos nucleicos y fosfolípidos. Además, el fósforo desempeña una función indispensable en el metabolismo energético; la elevada energía de la hidrólisis del pirofosfato y diversos enlaces de fosfato orgánico se utilizan para impulsar reacciones químicas (Bidwell, 1979).

En los diferentes medios de cultivo es comúnmente agregado como  $\text{PO}_4$  concentraciones de  $117,5 \text{ mg l}^{-1}$  (Murashige y Skoog, citado por Endress, 1994). Influyendo de forma notable en el crecimiento del explante, número de hojas y brotación (Lee y De Fossard, citados por Ramaje y Williams 2002).

Se han encontrado resultados que indican la relación entre altos niveles de este nutriente y la baja brotación en explantes *in vitro*, ya que se limita la viabilidad de otros minerales como  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Ca}^{+2}$  (Ramaje y Williams, 2002).

Es interesante ver otros elementos como el boro o calcio que tienen relación en su absorción. Cuando el primero es deficiente, reduce la absorción de P en *Daucus carota* (Goldbach, citado por Endress, 1994) , en el segundo caso; altas cantidades inhiben la absorción de P (Bidwell, 1979).

Para el cultivo *in vitro* Elkonin y Pakhomova (2000) demostraron su utilidad, principalmente en la inducción de embriogénesis somática ya que incrementos de PO<sub>4</sub> han demostrado incrementos en la frecuencia de embriones somáticos.

f. Azufre (S). Se puede decir que el azufre tiene funciones más especializadas, forma parte de los aminoácidos cistina, cisteína y metionina, y es un importante constituyente de proteínas, así como algunos compuestos de actividad biológica como el glutatión, la biotina, la tiamina y la coenzima A (Bidwell, 1979).

#### 3.3.1.2 Micronutrientes

En general los microelementos como Fe, Mn, Cu, Mo, I, B, Co Ni son considerados cofactores e inductores de síntesis de enzimas (Endress, 1994) por lo que se agregan en pequeñas cantidades (Bidwell, 1979) .

a. Hierro (Fe). Este es considerado muchas veces como elemento mayor, debido al consumo e importancia en la planta. La extraordinaria importancia radica en el hecho de que participa en sitios catalíticos de muchas enzimas óxido-reductoras importantes y es esencial para la formación de clorofila (Bidwell,1979). En 1977, Lee y De Fossard, demostraron que la supresión de este en un medio de micropropagación, se traduce en una notable reducción en crecimiento del explante ( Ramaje y Williams, 2002). Normalmente en los medios de cultivo este no puede ser suplido satisfactoriamente, por lo que se hace necesario agregar otras fuentes complejas en forma de EDTA (ácido etilendinitilotetraacético) (Endress, 1994)

b. Otros elementos. Existen elementos como el Mo o Cu que radican su importancia en el efecto sinérgico con otros que casi siempre son de mayor requerimiento para la planta. En este caso en particular, una deficiencia de Mo

se manifiesta como una de N, ya que el primero reduce nitratos y fija nitrógeno (Bidwell, 1979), una alta concentración de cobre inhibe la absorción y utilización de zinc y hierro (Remage y Williams, 2002).

Una deficiencia de manganeso causa al mismo tiempo una deficiencia de hierro y disminuye la absorción de zinc (Williams, citado por Ramaje y Williams, 2002).

Otros como el zinc, además de estar implicado en la síntesis de proteínas, tiene relación directa con la síntesis de ácido indolacético (AIA) y como tal su deficiencia puede causar cambios sustanciales en la forma y hábito de crecimiento de ciertas especies, produciendo plantas atrofiadas y de baja altura, con pobre desarrollo de la dominancia apical (Bidwell, 1979).

Todos estos nutrientes utilizados en los medios de cultivo para la micropropagación, son generalmente suministrados por fuentes minerales vendidas por casas comerciales transnacionales dedicadas a la manufacturación de un sin número de químicos de distinta finalidad. Para Costa Rica, la obtención de estos productos se realiza por medio la importación de los mismos, lo que sin duda alguna provoca una fuga de divisas del país y al mismo tiempo encareciendo el costo de las plantas producidas a nivel *in vitro*.

Sin embargo, son pocas las instituciones dedicadas a la investigación que se han interesado en buscar fuentes alternativas de minerales de bajo costo. Exceptuando por algunos trabajos realizados en Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales del Instituto Tecnológico de Costa Rica, en los cuales se han estudiado soluciones nutritivas para cultivos hidropónicos, obteniéndose resultados preliminares y en cierta forma aún exploratorios muy satisfactorios en cuanto a la respuesta de los explantes *in vitro* y en la reducción de los costos.

Es importante tomar en consideración que cualquier fuente alterna a utilizar debe poseer concentraciones parecidas a las ofrecidas por los medios de cultivo empleados comúnmente en la propagación *in vitro* o por lo menos saber cual es el aporte hecho por la fuente alterna a utilizar (ver cuadro 2).

**Cuadro 2.** Comparación entre la concentración de sales minerales según Murashige & Skoog y soluciones nutritivas para cultivos hidropónicos marca INDAGRO® (mg l<sup>-1</sup> de medio)

Elemento	Murashige y Skoog (1962)	Soluciones Hidropónicas, INDAGRO®		
	Macroelementos			
	Fuente	Disponibilidad del elemento (ppm)	Disponibilidad del elemento (ppm)	Relación aproximada para un MS 100%. (%)
Nitrógeno	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> y KNO <sub>3</sub>	840	500	60
Fósforo	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	26	200	762
Potasio	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> y KNO <sub>3</sub>	781	400	51
Calcio	CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O	120	200	167
Magnesio	MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	37	176	482
Microelementos				
Boro	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,10	1,80	165
Manganeso	MnSO <sub>4</sub> • 4H <sub>2</sub> O	91,30	2,00	2
Zinc	ZnSO <sub>4</sub> • 8H <sub>2</sub> O	1,85	1,20	65
Yodo	KI	0,64	0,00	0
Molibdeno	NaMoO <sub>4</sub> • 2H <sub>2</sub> O	0,10	0,10	100
Cobre	CuSO <sub>4</sub> • 5H <sub>2</sub> O	0,01	0,50	7868
Hierro	FeSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	5,56	7,80	140
Cobalto	CoCl <sub>2</sub>	0,01	0,00	0

### 3.3.2 Vitaminas

Las vitaminas son compuestos orgánicos que, a bajas concentraciones, desempeñan en el metabolismo celular funciones catalíticas y reguladoras (Devlin, 1980).

Se ha debatido durante muchos años la necesidad o no en las plantas de vitaminas, ya que es sabido que son autótrofas para estos nutrientes. Sin embargo, las plantas o explantes que se desarrollan a nivel *in vitro* aparentemente si las necesitan, al no ser estos organismos fotosintetizadores bien establecidos, por lo que se hace necesario en muchos casos la adición de

vitaminas del grupo B (piridoxina-HCl, ácido nicotínico, tiamina-HCl) , glicina y mio inositol (Endress, 1994).

Por otro lado existen autores que cuestionan la necesidad de emplear siempre vitaminas, ya que afirman que la mayor parte de las plantas son capaces de sintetizar vitaminas *in vitro* (Pierik, 1990).

Como ya se mencionó anteriormente las de uso rutinario son las pertenecientes al grupo B como B<sub>1</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, que generalmente están en medios convencionales, además de glicina que funciona como fuente de nitrógeno reducido, ácido nicotínico y myo-inositol que es componente importante de la región polar fosfolipídica de la pared celular (Endress, 1994). A estas se pueden agregar pantotenato de calcio, ácido fólico, riboflavina, ácido ascórbico, biotina, tocoferol (Pierik, 1990).

La mayoría de autores se ha preocupado poco de estudiar el efecto de las vitaminas en plantas tanto *in vitro* como *in vivo* , siendo las últimas en las que se han enfocado la mayoría de investigaciones pero orientadas en su mayoría a describir los acontecimientos fisiológicos en los que se encuentran implicadas.

#### 3.3.2.1 Vitamina A

La vitamina A no ha sido encontrada en las plantas. Sin embargo sus precursores, los carotenoides, se encuentran en todos los órganos de la planta y son sintetizados *in situ* en el mismo órgano en el cual se encuentran (Bonner, citado por Devlin 1980).

#### 3.3.2.2 Vitamina B1 (Tiamina)

La importancia de la B<sub>1</sub> para el metabolismo celular, radica en el papel como coenzima en la descarboxilación de los  $\alpha$ -cetoácidos (Devlin, 1980).

Según Bonner (citado por Devlin, 1980) la tiamina se encuentra en concentraciones máximas en las regiones de la planta sede del crecimiento activo. Este mismo autor señala la posibilidad de que se sinteticen en la hojas y que con frecuencia depende de la luz.

Para visualizar el efecto de su deficiencia en la planta, se han colocado raíces de plantas en condiciones *in vitro* lográndose constatar un atrofiamiento en el crecimiento de las mismas en condiciones de nula presencia de tiamina (Devlin, 1980).

A nivel de micropropagación se ha demostrado que el uso de la B<sub>1</sub>, a concentración de 2 mg l<sup>-1</sup>, resulta adecuada para la inducción de callos (Gómez *et al.*, 1995)

### 3.3.2.3 Vitamina B<sub>2</sub> (Riboflavina)

La riboflavina se encuentra de modo general en las plantas (Alberg citado por Devlin, 1980). Esta se encuentra en cantidades bastante elevadas dentro de la mayoría de órganos que componen la planta, por lo que se hace prácticamente imposible establecer cuales son los síntomas de su deficiencia (Devlin, 1980), aunque autores como Gleston y Baker citados por Devlin (1980) la relacionan como ente inactivador de las auxinas.

### 3.3.2.4 Vitamina B<sub>5</sub> (Ácido nicotínico)

La mayor importancia del ácido nicotínico radica en el hecho que forma parte del NADP y del NAD (Devlin, 1980). Glaston (citado por Devlin, 1980) encontró que el ácido nicotínico tiene un efecto sinérgico con la estimulación por el AIA de la producción de raíces vegetales. Además encontró que el AIA tiene una acción antagónica de la estimulación del crecimiento de yemas laterales debidos al ácido nicotínico.

### 3.3.2.5 Vitamina B<sub>6</sub> (Piridoxina)

En general, la piridoxina se encuentra dispersa por toda la planta encontrándose en los tallos, hojas, raíces, semillas y frutos (Bonner y Bonner, citados por Devlin 1980).

Por otro lado Almenstrad citado por Devlin (1980) ha observado una disminución de la actividad meristemática de raíces aisladas debida a la deficiencia en vitamina B<sub>6</sub>. Se opina también que esta puede participar en la síntesis de triptofano y ácido nicotínico (Devlin, 1980).



### 3.3.2.6 Biotina

La biotina se ha encontrado en todas las partes de las plantas superiores (Bonner *et al.*, citados por Devlin 1980).

Al igual que en el caso de los minerales, las fuentes de las vitaminas son generalmente proveídas por casas productoras químicas transnacionales como MERCK<sup>®</sup> o SIGMA<sup>®</sup>. Sin embargo, se pueden utilizar fuentes (ver cuadro 3) alternativas como las tabletas utilizadas para el consumo las cuales comúnmente son fuente rica en vitaminas del grupo B (B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub> y B<sub>12</sub>), estas son poco utilizadas y hasta desconocidas por la mayoría de personas que trabajan con cultivos en condiciones *in vitro*.

**Cuadro 3.** Comparación entre la concentración de vitaminas según Murashige & Skoog y tabletas para consumo humano marca Neurobine<sup>®</sup> (mg l<sup>-1</sup> de medio)

Vitamina	Murashige & Skoog, 1962	Tabletas para consumo humano Neurobine <sup>®</sup>	
	Disponibilidad de la vitamina (ppm)	Disponibilidad de la vitamina (ppm)**	Relación aproximada para un MS 100% (%)
Myo-inositol	100	0	0
Tiamina-HCl	0,1	200	200 000
Ácido Nicotínico	0,5	0	0
Piridoxina-HCl	0,5	50	10 000
Cianocobalimida	0	1	*
Glicina	2	0	0

\* 1 No tiene equivalencia

\*\* 2 Contenido en una pastilla

### 3.3.3 Sacarosa

La sacarosa es uno de los componentes primordiales de cualquier medio de cultivo para micropropagación, debido a que las plantas o explantes se encuentran en condiciones que le impiden un proceso fotosintético adecuado que la provea de carbono para su metabolismo (Pierik, 1990). Generalmente se utiliza por ser un disacárido sintetizado y transportado naturalmente por la planta (Pierik, 1990), aprovechándose al máximo sin causarle trastornos.

Sin embargo existen otras fuentes como las que se observa a continuación:

**Cuadro 4.** Carbohidratos utilizados para el cultivo *in vitro* de plantas

Comúnmente Utilizados	Escasamente Utilizados
Glucosa	Lactosa
Sacarosa	Galactosa
Glicerol	Melaza
Pentosa	Almidón de papa
-----	Almidón de cereal

**Fuente.** Endress. 1994.

Existen cultivos que poseen heterotroficidad en suspensiones celulares , lo cual les permite satisfacer sus requerimientos energéticos (Bergmann citado por Endress, 1994).

En cuanto a la concentración a la cual debe utilizarse, es dependiente principalmente del cultivo y objetivo a cumplir; aunque generalmente se usa en concentraciones que van desde 1 a 5 % (de disacárido) (Pierik, 1990).

La sacarosa que se vende comúnmente en los supermercados resulta generalmente adecuada, ya que se trata de un producto purificado, y de acuerdo con los análisis de los fabricantes se compone de un 99,94% de sacarosa, 0,02% de agua y 0,04% de otras sustancias (Pierik, 1990). Lo que además permite disminuir el costo en la producción de plantas *in vitro*.

### 3.3.4 Reguladores de crecimiento

Existen diversas definiciones en torno al término reguladores de crecimiento, de las cuales la ofrecida por Pierik (1990) es la mas aceptable en donde se explica este como un compuesto orgánico sintetizado por las plantas superiores, que influyen sobre el crecimiento y desarrollo, actúan generalmente

en lugar diferente a donde son producidas y se encuentran presentes y activas en muy pequeñas cantidades.

Su existencia fue propuesta primeramente por el biólogo Harberlant a principios del siglo XX, ya que dentro de las conclusiones o supuestos planteados en sus estudios insinuó la presencia de algún tipo de sustancias responsables del crecimiento de las plantas (Palma y Montero, 2002).

Su importancia queda reflejada en los estudios realizados por Went en donde hizo su famosa aseveración *Ohne Wuchstoff kein Wachustum* (“Sin sustancias de crecimiento, no hay crecimiento”) (Weaver, 1976).

En los últimos años se ha explorado la relación de éstos con la composición mineral del medio (Prece, citado por Ramaje y Williams 2002). Ya que aparentemente este es un factor que afecta de sobremanera la sensibilidad de los explantes a los reguladores de crecimiento.

En el cultivo *in vitro* de las plantas superiores, los reguladores especialmente las auxinas y citocininas, juegan un papel muy importante se puede decir que el cultivo *in vitro* es generalmente imposible sin reguladores (Pierik, 1990).

#### 3.3.4.1 Auxinas

Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un agrandamiento y alargamiento celular; sin embargo, se ha encontrado que también promueven la división celular en el cultivo de tejidos (Roca y Mroginski, 1991).

Dentro de este grupo existen tanto sustancias de origen natural como la ácido indolacético (AIA) (Pierik, 1990) de baja actividad y altamente fotosensibles. El ácido indolacético (AIB), ácido naftalenacético (ANA) y 2,4-D (2,4- dichlorophenoxyacetic ácido) son sintetizadas industrialmente y se utilizan en concentraciones de 0,001 a 10 mg l<sup>-1</sup>, por el alto efecto en su acción (Pierik, 1990).

Cumplen funciones importantes en la expansión de las células de tallos y coleoptilos (Weaver, 1976). Además producen: elongación celular y expansión de tejidos, división celular (formación de callo), y formación de raíces adventicias, inhibición de la formación de vástagos axilares y adventicias, y frecuentemente embriogénesis en los cultivos en suspensión. Con una baja concentración predomina la formación de raíces adventicias mientras que con altas concentraciones no se producen raíces y tiene lugar la formación de callo (Pierik, 1990).

#### 3.3.4.2 Citocininas

Skoog *et al.*, (1955) propusieron el término “cinina” como un nombre genérico para sustancias naturales y sintéticas que presentaban los mismos tipos de actividad biológica que la Kin(6-furfuril-aminopurina) (Roca y Mroginski, 1991).

Estas son utilizadas frecuentemente para estimular el crecimiento y el desarrollo; siendo las más comunes: cinetina (Kin), bencil adenina (BA) y 6, dimethylalylamino purina (2iP) (Pierik, 1990).

Además de fomentar la división celular, las citocininas influyen en la diferenciación de los cultivos. Interactúan con las auxinas para mostrar expresiones diferentes de crecimiento (Weaver, 1976). Skoog y Miller (1957) demostraron *in vitro* el modo en que cualquier cambio del equilibrio entre citocininas y auxinas, puede afectar las expresiones del crecimiento. Encontraron que en cultivos de médula de tabaco requieren tanto citocininas como auxinas para su crecimiento activo. Cuando la cantidad de citocininas es baja en proporción con las auxinas, se produce un desarrollo de raíces; pero cuando es elevada, se desarrollan tanto las yemas como brotes. Cuando la relación es intermedia, se desarrollan tejidos de callos no diferenciados.

En el caso de las musáceas se utilizan en concentraciones hasta de 3 mg l<sup>-1</sup> para promover el desarrollo de vástagos adventicios (Palma y Montero, 2002).

### 3.3.4.3 Otros Reguladores

Existen un grupo de regulares que por su poca importancia en el cultivo de tejidos, se pueden apartar de los anteriores. Tal es el caso de las giberelinas, ácido abscísico, inhibidores de crecimiento y etileno. De los cuales este último tiene cierta importancia, ya que se produce con el flameo utilizado para la desinfección de instrumentos en el manipuleo de los explantes a nivel *in vitro*, lo que luego provoca un crecimiento anormal (ageotrópico) de las plantas<sup>5</sup>.

### 3.3.5 Gelificantes

La efectividad de un cultivo depende tanto de los ingredientes básicos-nutrientes, azúcar y hormonas- como del agente gelatinizador (Romberger; Tabor; Bending; Lorz *et al.*, citados por Roca y Mroginski 1991).

Comúnmente es utilizado el agar en diversas presentaciones (ver cuadro 6), como el agente encargado de gelatinizar o solidificar el medio de cultivo. Pierik (1990) lo ha definido como un derivado de una alga marina, que se obtiene en forma de píldora. Aunque se trata de un producto natural, se lava y purifica durante su elaboración, de manera que prácticamente no contiene materiales tóxicos. Es un polisacárido con una elevada masa molecular, que tiene capacidad para gelificar los medios.

Este polisacárido ha sido obtenido desde 1658 a partir de las algas rojas *Gelidium* y *Gracilaria*. En 1859 fue descrita por primera vez en el Western World y Robert Koch (1882) e introducida como gelificante para comida ( Endress, 1994).

Los agentes gelificantes son colocados en los medios de cultivo con el fin de suplir de oxígeno al explante, además permite la absorción adecuada de las diferentes sales y nutrientes que posee el medio (Endress, 1994).

---

<sup>5</sup> Palma, P. 2003. San Carlos, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

**Cuadro 5.** Concentración de minerales en algunos agentes gelificantes

Componente	Agente Gelificante		
	Bacto Agar, Difco <sup>®</sup>	Gelrite <sup>®</sup>	Almidón de maíz
Ceniza(%)	2,2	7,09	0,16
Nitrógeno(%)	0,02	0,07	0,09
Magnesio(%)	0,24	0,4	0,02
Calcio(%)	0,45	0,89	*
Cobre(ppm)	2	6,81	1,95
Hierro(ppm)	2,87	8,63	1,26
Zinc(ppm)	4,6	9,18	0,13

\* No detectado.

**Fuente.** Puchooa *et al.*, 1999.

La concentración, así como el tipo de gelificante, tiene efectos dramáticos sobre el crecimiento y desarrollo de los explantes (Williams, citado por Ramaje y Williams 2002). Uno de los efectos más estrechamente relacionado con este aspecto es la vitrificación, el cual se asocia con un bajo potencial mátrico (Debergh, citado por Singha *et al.*, 1990). Chacón *et al.*, (2000) observaron síntomas asociados al fenómeno de hiperhidricidad y su incidencia fue mayor conforme disminuyó la dosis del gelificante.

Así pues con el incremento en la concentración de agar en el medio desde 0,6 a 1,2%, también causa un detrimento en el número de brotes en micropropagación de *Cydonia oblonga* (Singha *et al.*, 1990).

**Cuadro 6.** Descripción de los principales productos usados como gelificantes

Tipo de Agar	Descripción	Dosis Recomendada(g l <sup>-1</sup> )
Agar	Uso general. Investigación o producción comercial	6 a 12
Agar Bacteriológico	Para la mayoría de trabajos bacteriológicos	*
Agar tipo A	Buen grado bacteriológico	6 a 12
Agar tipo E	Uso general.	5 a 10
Agar tipo M	Uso general	5 a 10
Agar alta solidificación	Cuando se requiere firmeza en el medio	4 a 6
Agar Purificado	Investigación y cultivo de protoplastos	9 a 10
Agar lavado	Investigación y cultivo de protoplastos preparado a partir de agua purificada	9 a 10
Agarosa	Gelifica a baja temperatura	6 a 10
Agar algínico	Para cultivo, de protoplastos o células en suspensión	*
Agargel	Mezcla de agar y phytigel que mejora ambos productos.	3,5 a 5
Phytigel	Produce un gel trasparente de alta solidificación	1,5 a 2

\* Información no disponible.

**Fuente.** Palma y Montero. 2002.

No solo el agar (en todas sus presentaciones) es el único agente utilizado como agente gelatinizante. Existen otras alternativas como algunos polímeros sintéticos (ver cuadro 7), alginatos, un estabilizador de sustrato derivado de agregados cristalíticos de celulosa (Pierik, 1990). Otra alternativa es el uso de materiales de soporte en medios líquidos como espuma de plástico, papel filtro, bolas de vidrio o una esponja viscosa (Pierik, 1990) .

Es sabido que este es con facilidad, el componente más caro de los medios nutritivos sólidos (Pierik, 1990). Es por eso que algunos países principalmente en vías de desarrollo como Costa Rica o la India, han venido realizando trabajos para tratar de encontrar agentes gelificantes que muestren un comportamiento similar o mejor a los geles de carácter industrial.

## Cuadro 7. Polímeros utilizados para solidificar medios de cultivo

---

### Agente Gelificante

---

Agar

Alginato

Gelatina

Celulosa Hidroxitífica

Poliacrilamida

Almidón

Geles silicados

---

**Fuente.** Pierik. 1990.

Un sin número de trabajos en donde se han evaluado diversos agentes como polyacrylamida ( Wang & Hu, 1980), extractos de tejidos de mucílago (Tietel *et al.*, 1987), polisacáridos microbiológicos (Kang *et al.*, 1982), agarosa (Liu, 1989) almidones de plantas (Sorvari *et al.*, citados por Bhattacharya *et al.*, 1994), *psyllium* (Sahay, 1999) y sago<sup>6</sup> (Bhattacharya *et al.*, 1994).

Ensayos llevados a cabo por Bhattacharya *et al.*, (1994) en donde se comparó los efectos de dos tipos de gelificantes alternativos (*psyllium* y sago) y agar, en cultivos *in vitro* de crisantemo. Dichos autores lograron determinar que la mayor longitud de los brotes, raíces y hojas, además del número de brotes en las plántulas fueron obtenidos en medios solidificados con agar. Sin embargo, se logró obtener una significativa diferencia en el número de raíces en los medios solidificados con *psyllium* y sago; además las plántulas producidas en medios solidificados con estos gelificantes, no mostraron diferencia en cuanto al estado de salud, mostrando hojas normales (color verde adecuado).

---

<sup>6</sup> Harina obtenida de la medula de la palma *Metroxylon sagu*



Otra opción es el almidón de maíz, el cual ha sido utilizado en investigaciones preliminares llevadas a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas Tropicales del Instituto Tecnológico de Costa Rica, obteniendo resultados satisfactorios (datos obtenidos en observaciones realizadas por Palma, 2002). Henderson y Kinnersley (citados por Bhattacharya *et al.*, 1994) reportaron que cultivos celulares de tabaco y zanahoria desarrollados en medios de cultivo solidificados con almidón de maíz, produjeron más del triple en el peso seco, en comparación con medios solidificados con agar.

Zimmerman *et al.*, (1995) obtuvieron una alta proliferación de brotes en cultivos *in vitro* de manzana en medios solidificados con almidón de maíz y Gelrite (en una proporción 50 g l<sup>-1</sup> : 0.5 g l<sup>-1</sup> respectivamente) en comparación con los medios solidificados con agar logrando reducir en más de un 90 % el costo de solidificación.

### 3.3.6 Agua

Líquido de vital importancia ya que constituye el 95% del medio nutritivo, por lo que se debe prestar una gran atención a la calidad del agua (Pierik, 1990).

Por lo tanto es prácticamente imprescindible la utilización de agua destilada para la elaboración del medio. Sin embargo, se ha utilizado sustituyentes parciales como el endospermo de coco (agua de coco), la cual ya desde 1942, van Overbeek, Conklin y Blakeslee la ha utilizado para la micropropagación de *Datura*, obteniendo resultados bastante satisfactorios (Roca y Mroginski, 1991).

Para el año de 1948, Caplin y Steward identificaron el potencial del agua de coco para inducir la división celular en tejidos diferenciados; lo observaron por primera vez en el parénquima del floema secundario de la raíz de la zanahoria cultivada (Roca y Mroginski, 1991), descubriéndose su efecto citocinínico.

En observaciones hechas por Palma (2002) se demuestra este mismo efecto en cultivos *in vitro* de orquídeas (*Phalenopsis sp.*). Hay que tener

presente que por su composición química irregular no es aconsejable utilizar en investigaciones o para producción masiva (Roka y Mroginski, 1991).

### 3.3.7 Otros componentes

#### 3.3.7.1 Caseína hidrolizada (CH)

La CH digerida enzimáticamente se ha utilizado de forma rutinaria como un suplemento de medios de cultivo para plantas (Steward *et al.*, citado por Roca y Mroginski, 1991). Fungiendo como una fuente adicional de nitrógeno, para algunas especies..

#### 3.3.7.2 Carbón activado

Este componente se produce por la carbonización de la madera, a alta temperatura, en presencia de vapor. Posee una red muy fina de poros, con una gran superficie interna, en la cual puede ser absorbidas todo tipo de sustancias (Pierik, 1990).

Posee funciones diversas funciones: adsorción de pigmentos tóxicos, adsorción de compuestos orgánicos, puede promover embriogénesis somática, estabiliza el pH, es posible que elimine o absorba sustancias que pueden promover el crecimiento (Pierik, 1990).

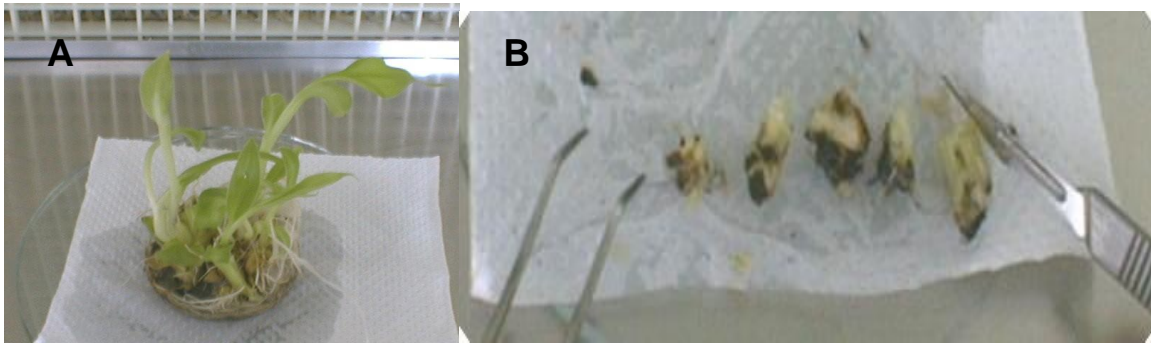
## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Ubicación del estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Cultivos Tropicales del Centro de Investigación y Desarrollo de la Agricultura Sostenible para el Trópico Húmedo (CIDASTH), ubicado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos (ITCR, SSC); durante el segundo periodo lectivo (entre julio y noviembre) del 2003.

### 4.2 Material experimental

Los explantes necesarios para el desarrollo de esta investigación fueron obtenidos de plantas madre *in vitro* (ver figura 2), las cuales son parte de la colección de especies del laboratorio en donde se llevó a cabo la investigación. Estos fueron colocados en tubos de ensayo de 25 mm x 150 mm, conteniendo 15 ml de medio, encubados a  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$ , noventa por ciento de humedad relativa, un fotoperiodo de 16 horas luz, una intensidad lumínica de 2000 lux suplidos por fluorescentes de luz blanca marca Sylvania® Gro-lux de 20 w.



**Figura 2.** Material experimental. A) Plantas madre *in vitro* donantes de los explantes iniciales . B) Explantes iniciales

### 4.3 Tratamientos y análisis de datos

#### 4.3.1 Tratamientos evaluados

Para evaluar las respuestas morfogénicas de explantes de brotes de plátano (*Musa AAB* cv Curaré), un medio de cultivo con sustitución de insumos, se procedió a realizar dos medios de cultivo diferentes (ver cuadro 8). El primero (medio convencional; testigo) consta de sales según concentraciones de Murashige y Skoog (1962), suplementado con  $400 \text{ mg l}^{-1}$  de glutamina,  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de myo-inositol,  $0,50 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido nicotínico,  $0,50 \text{ mg l}^{-1}$  de piridoxina-HCl,  $0,1 \text{ mg l}^{-1}$  de tiamina,  $30 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa y  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de benciladenina, solidificado con agar (0,6% m/v); todos estos insumos son suministrados por SIGMA<sup>®</sup>, MERK<sup>®</sup> y DIFCO<sup>®</sup>.



**Figura 3.** Fuentes de sales minerales, gelificante y vitaminas utilizados en la elaboración del medio con sustitución de insumos

El otro medio (medio con sustitución de insumos) contiene sales suplidas por fertilizantes para cultivos de sustrato hidropónico de INDAGRO<sup>®</sup>, 1 pastilla/l de vitaminas (contiene  $50 \text{ g l}^{-1}$  piridoxina-HCl,  $200 \text{ mg l}^{-1}$  tiamina y  $1000 \mu\text{g l}^{-1}$  cianocobalamida) para consumo humano marca Neurorubine<sup>®</sup>, suplida por la casa comercial Mepha<sup>®</sup>. Gelificado con  $70 \text{ g l}^{-1}$  de almidón de maíz marca MAIZENA<sup>®</sup> (ver figura 3); en concentraciones similares a las sugeridas por Murashige y Skoog (1962). Además el medio de cultivo es suplementado con  $100 \text{ mg l}^{-1}$  de myo-inositol,  $0,50 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido nicotínico,  $3 \text{ mg l}^{-1}$  de

benciladenina y  $30 \text{ g l}^{-1}$  de sacarosa, suplidos por fuentes convencionales. Con este tratamiento se logrará sustituir las fuentes convencionales y de alto costo que proveen las sales, vitaminas y gelificante comerciales.

El pH del medio fue ajustado a  $5,7 \pm 0,1$  antes de la adición de los gelificantes. Se dispensaron 15 ml del medio de cultivo por tubo de ensayo de 25 mm x 150 mm. Se realizaron sub cultivos a medio fresco cada 30 días (4 semanas). El medio fue autoclavado a  $1,4 \text{ Kg cm}^2$  y  $120 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 minutos.

**Cuadro 8.** Tratamientos para estudiar el efecto de la sustitución de insumos para la micropropagación de plátano ( *Musa AAB* cv Curraré ), Laboratorio de Biotecnología de Cultivos Tropicales, del ITCR, SSC, 2003

Componentes	Tratamiento 1 (Medio MS convencional)	Tratamiento 2 (Medio con sustitución insumos)
Macroelementos ( $\text{ml l}^{-1}$ )	50*	10**
Microelementos ( $\text{ml l}^{-1}$ )	10*	5**
Vitaminas (unidad/l)	10 ml*	1 pastilla/litro***
Mio-inositol ( $\text{ml l}^{-1}$ )	10	10
Fe EDTA ( $\text{ml l}^{-1}$ )	10	10
Benciladenina ( $\text{ml l}^{-1}$ )	3	3
Sacarosa ( $\text{g l}^{-1}$ )	30	30
Gelificante ( $\text{g l}^{-1}$ )	7.5 (Agar Agar <sup>TM</sup> )****	70 (Almidón maíz)****

Nota: los insumos de ambos tratamientos se encuentran expresadas en alícuotas de soluciones madres .

\* Suministrados por SIGMA<sup>®</sup> o MERK<sup>®</sup>.

\*\* Suministrados por INDAGRO<sup>®</sup>.

\*\*\* Suministrada por MEPHA<sup>®</sup>.

\*\*\*\* Suministrado por MAIZENA<sup>®</sup>.

\*\*\*\*\* Suministrado por DIFCO<sup>®</sup>.

Cada tratamiento estuvo repetido cuatro veces, y cada repetición constó de 10 tubos de ensayo (conteniendo un explante).

#### 4.3.2 Modelo estadístico

$$Y_{ij} = \mu + T_t + E_{ij}$$

En donde:

$Y_{ij}$  = Variable de respuesta.

$\mu$  = Promedio general.

$T_t$  = Promedio del tratamiento;  $t = 1$  y  $2$ .

$E_{ij}$  = Error experimental.

#### 4.3.3 Análisis de datos

Una vez realizadas todas las evaluaciones se obtuvieron las medias aritméticas con sus respectivas desviaciones estándar, en cada variable de los tratamientos por semana. Con el fin de comparar el rendimiento final se evaluó los resultados de la semana 8, mediante la prueba T estudent para grupos independientes en cada variable para los dos tratamientos. Todo esto procesado mediante el paquete estadístico INFOSTAT<sup>®</sup>.

### 4.4 Variables evaluadas

Para cuantificar el comportamiento de los tratamientos descritos con anterioridad (Cuadro 8) se realizaron evaluaciones cada ocho días, durante 8 semanas, midiendo las siguientes variables:

#### 4.4.1 Porcentaje de supervivencia

Se realizó un conteo visual de los individuos muertos (explantes necrosados sin respuesta), con lo cual se obtuvo el cociente entre éste y el número de individuos vivos, para su posterior multiplicación por cien. Se identificó las posibles causas de muerte por métodos visuales, con el fin de determinar y analizar los posibles problemas de orden patológico o fisiológico (oxidación o hiperhidricidad) presentes durante la investigación.

#### 4.4.2 Número de brotes

Se determinó por medio de un conteo visual, considerando los que presentan tamaños arriba de 3 mm. No se contabilizaron los brotes sumergidos en el medio de cultivo semana a semana, solo en el momento de cambiar el medio y en la última semana de evaluación, momentos en los cuales los individuos son extraídos.

#### 4.4.3 Longitud de los brotes

Se identificaron de forma visual el brote de mayor longitud, el cual será medido con un regla calibrada en centímetros. La medición se realizó desde la base del mismo hasta el extremo superior de las hojas.

#### 4.4.4 Número de raíces

Se contabilizó de forma visual tanto las raíces externas como las sumergidas en el medio de cultivo.

#### 4.4.5 Longitud de raíces

Se identificó de forma visual la raíz con mayor longitud, la que será medida mediante una regla calibrada en centímetros.

#### 4.4.6 Número de rojas

Se realizó un conteo visual de las mismas, tomando en consideración aquellas que posean todas las estructuras propias de una hoja.

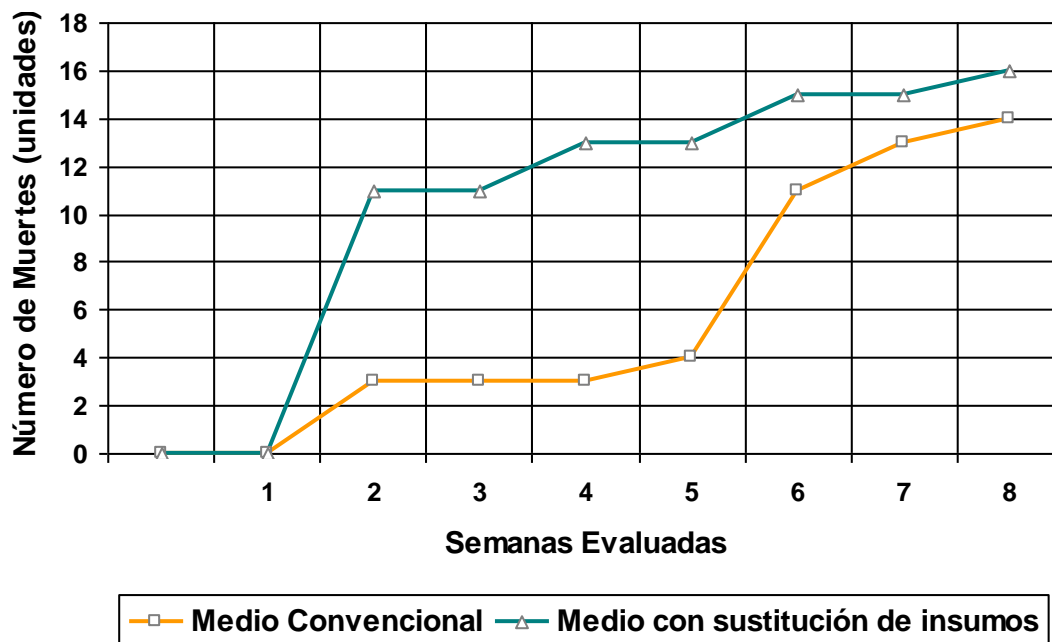
Todas estas mediciones se realizaron a través de los tubos de ensayo o envases conteniendo cada individuo, ya que no puede ser extraído del medio de cultivo, salvo en las ocasiones cuando se haga necesario un transplante a medio fresco o al finalizar las evaluaciones.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Porcentaje de supervivencia

Al evaluar la supervivencia de explantes de plátano (*Musa AAB* cv. Curaré), no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los medios evaluados. Para el medio convencional esta fue de 73,08% y de 69,23% en el medio con sustitución de insumos.

Durante las ocho semanas de evaluación, se observaron tres causas principales de muerte: contaminación por hongos, contaminación por bacteria y muerte causada por la oxidación de fenoles, fenómeno muy común en el cultivo *in vitro* de musáceas. Estas tres causas de muerte expresan la presencia de error de tipo humano, ya que los índices mas altos de muerte se observaron en la segunda y sexta semana (ver figura 4), periodos posteriores a la siembra y transferencia a medio de cultivo fresco, en donde los explantes son expuestos a condiciones de alta contaminación ambiental. Prueba de ello es el aumento en la contaminación observada debida agentes fúngicos observada durante la sexta semana de evaluación, en el medio convencional.



**Figura 4.** Número de explantes muertos (acumulados) en el medio convencional y en el de sustitución de insumos, contabilizados durante las ocho semanas de evaluación



Se observó una alta incidencia de oxidación en el medio con sustitución de insumos, en la segunda semana de evaluación, debido a un excesivo sumergimiento del explante en el medio, al realizarse la operación de inoculación. Sin embargo, este problema se puede solucionar colocando superficialmente los explantes en el medio o utilizando materiales como papel filtro que sirvan de soporte de los explantes en el medio de cultivo.

Por otro lado el medio con sustitución de insumos presentó dificultades para observar la presencia de agentes contaminantes dentro del medio como bacterias.

## 5.2 Número de brotes

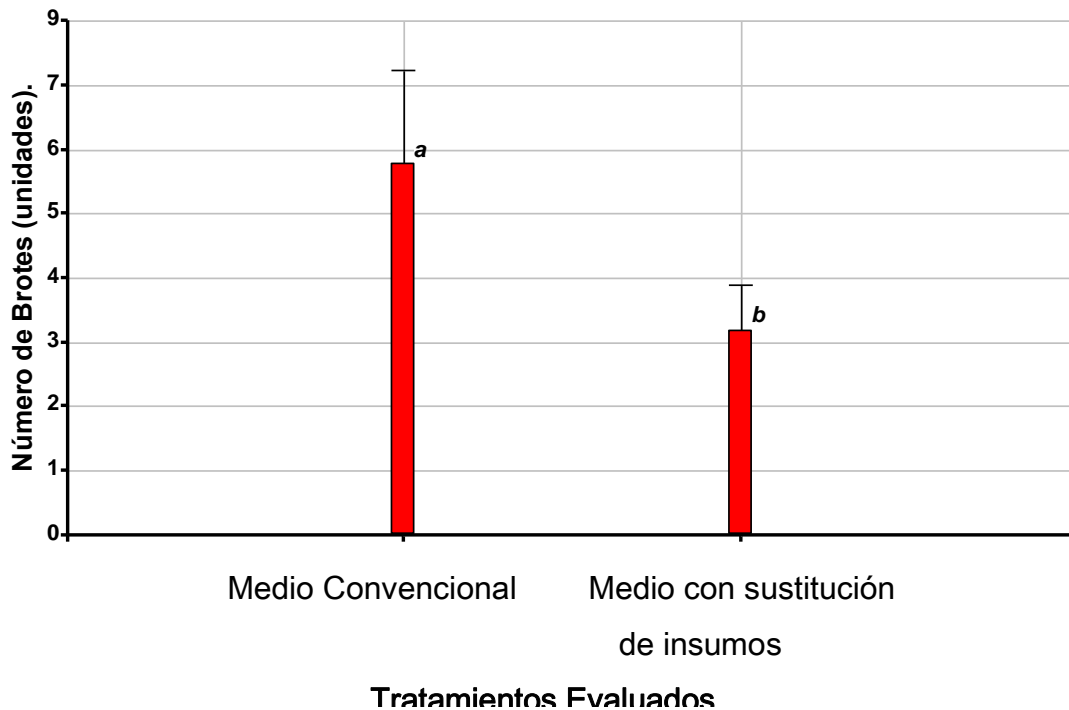
La regeneración de brotes, fue constante durante el periodo de evaluación. Esta fue significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor cuando el explante se desarrolló en el medio convencional, obteniéndose un rendimiento medio de  $6,14 \pm 1,54$  brotes por explante, en comparación con el medio con sustitución de insumos, en el que se cuantificó  $3,38 \pm 0,77$  brotes por explante (ver figura 5).

La regeneración de brotes es consecuencia de un sin número de factores, tanto endógenos como exógenos a la planta. En este caso en particular, puede que el agente causal provenga del efecto de la concentración de sales en el medio con sustitución de insumos, el cual posee niveles bajos de nitrógeno, zinc, potasio y hierro (ver cuadro 2). Está demostrado que la supresión del nitrógeno en el cultivo *in vitro* inhibe la formación de brotes (Ramaje y Williams, 2002). Así pues estos mismos autores lograron demostrar que la omisión de elementos como nitrógeno, fósforo y potasio provocan un detrimento en el desarrollo del explante.

El zinc es un mineral menor que presenta sinergismo con el nitrógeno, por lo cual una baja presencia de este puede provocar una baja asimilación del segundo, contribuyendo en la deficiencia y los efectos del mismo.

La hormona predominante en ambos tratamientos fue la benciladenina (citocinina), la cual es promotora de la brotación en la mayoría de plantas, pero su efecto depende de la proporción con la auxina. En este caso, la auxina

existente es de carácter endógeno, la cual es promovida por una serie de nutrientes y factores dentro de la planta. Uno de esos nutrientes ya mencionados es el zinc, por lo tanto es de suponer que una baja concentración de este en el sustrato puede provocar un detrimento en la concentración endógena de auxina (principalmente AIA). Un desbalance en la proporción de ambos reguladores de crecimiento puede provocar variantes negativas en el crecimiento y desarrollo de las plantas *in vitro* (Skoog y Miller, 1954).



**Nota:** letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ )

**Figura 5.** Número de brotes promedio para el medio convencional y en el medio con sustitución de insumos, contabilizados al cabo de ocho semanas

En lo que respecta al efecto del fósforo en número de brotes altos niveles de éste provoca la precipitación de otros nutrientes, lo que a su vez se traduce en un bajo número de brotes (Ramaje y Williams, 2002), efecto que puede estar representado en los resultados obtenidos en esta investigación.

El hierro, es otro nutriente que puede verse afectado por las altas cantidades de fósforo, al igual que el calcio (Skoog y Miller, 1954), lo que puede disminuir el efecto del hierro en las funciones de la planta como la participación

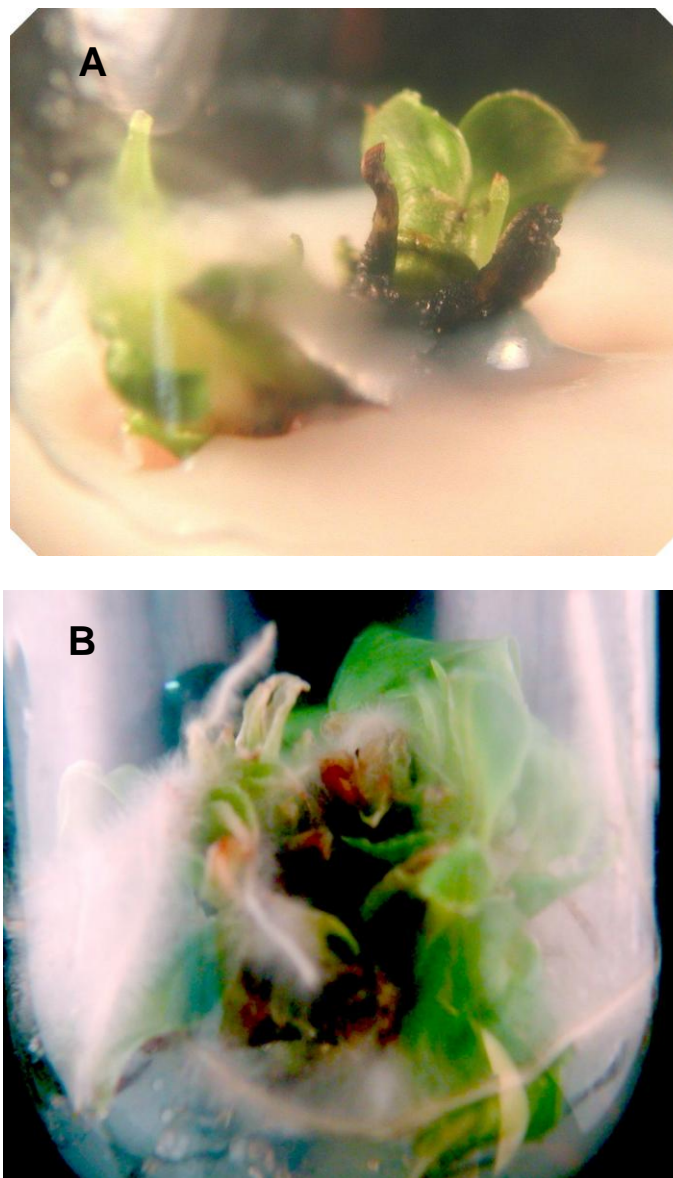
en sitios catalíticos de muchas enzimas óxido-reductoras importantes y es esencial para la formación de clorofila (Bidwell, 1979).

El cobre, es otro de los elementos un elemento que se encuentra en el medio con sustitución de insumos en concentraciones muy superiores a las suministradas por el medio convencional (ver cuadro 2), situación que puede afectar la absorción de elementos como el nitrógeno, zinc y hierro, pudiendo contribuir en el poco rendimiento mostrados por los explantes en lo que a producción de brotes se refiere. Además, está comprobado que tiene efecto inhibitorio sobre la emergencia de brotes (Sachum *et al.*, citados por Kintzios *et al.*, 2001).

A esto hay que agregar efectos aún desconocidos sobre las soluciones hidropónicas, como la precipitación causada por el sometimiento de los medios de cultivo a esterilización por medio del autoclave.

Las vitaminas pueden tener un efecto mínimo en el desarrollo de brotes posiblemente es mínimo. Existen algunos autores que cuestionan la aplicación de estas en todos los cultivos a nivel *in vitro* ya que algunas especies son capaces de sintetizarlas (Pierik, 1990). Aun así, la presencia de estas en el medio con sustitución de insumos presentó concentraciones mayores a los requeridos (ver cuadro 2).

Es importante acotar el hecho de la ausencia de glicina en este tratamiento, lo cual disminuye la presencia de nitrógeno en el medio, con sus posibles implicaciones.

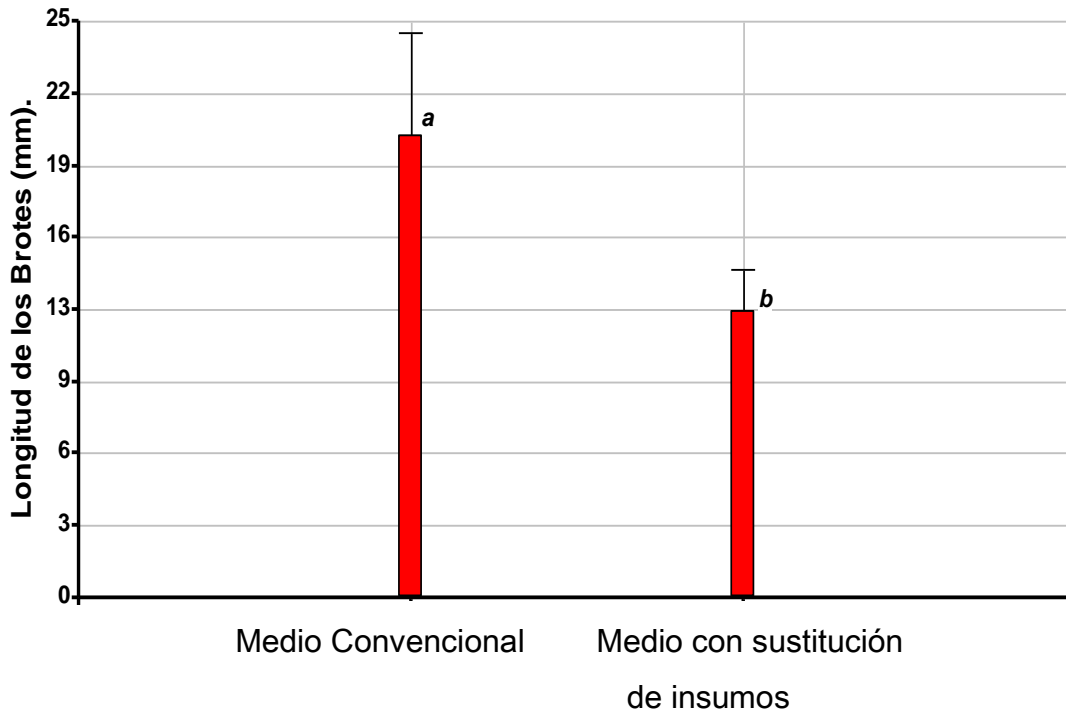


**Figura 6.** Explantes desarrollados después de ocho semanas de evaluación. A) Desarrollo de explantes en el medio con sustitución de insumos. B) Desarrollo de explantes en el medio convencional

El gelificante sustituyente (almidón de maíz) pudo no ser un factor determinante en el rendimiento del medio con sustitución de insumos, ya que algunos autores como Puchooa *et al.*, (1999), Henderson y Kinnenersley (1988) han probado este tipo de gelificante obteniendo resultados similares a los obtenidos con medios convencionales.

### 5.3 Longitud de los brotes

El medio convencional permitió una mayor longitud de los brotes (sobre el medio con sustitución de insumos, siendo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ). En donde el primero obtuvo un promedio en la longitud de  $20,02 \pm 4$  mm y  $12,39 \pm 1$  mm en el segundo (ver figura 7).



**Nota:** letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Figura 7.** Longitud media de los brotes desarrollados, en un medio convencional y un medio con sustitución de insumos al cabo de ocho semanas de evaluación

Al igual que el número de brotes, la baja concentración de nitrógeno (ver cuadro 2) en el medio con sustitución de insumos puede ser un aspecto influyente en la longitud de los brotes, ya que está implicado en el desarrollo de la estructura por parte de la planta, al ser este componente indispensable de las proteínas y amino ácidos (Bidwell, 1979).

Otro elemento como el potasio ha sido vinculado con el desarrollo de los brotes. Lee y De Fossard (citados por Ramaje y Williams, 2002), detectaron que diferentes explantes en medios de cultivo con nula presencia de este nutriente presentó poco o nulo desarrollo de los brotes. Este aspecto puede ser vinculado

con la poca longitud adquirida por los brotes sometidos al medio con sustitución de insumos, debido a la poca presencia de este elemento en dicho tratamiento (ver cuadro 2).

Ya se mencionó el efecto de las auxinas sobre el elongamiento de las células (Bidwell, 1979), y como es que estas interactúan con las citocininas para contribuir al desarrollo de los órganos que conforman las plantas (Skoog y Miller, 1954). Por lo cual puede que una baja concentración de auxinas endógenas provoque un desequilibrio en el desarrollo de los explantes. Mas aún, es posible que aunque se desarrollen brotes estos no se elonguen lo suficiente.

Anteriormente se mencionó el efecto que tiene el zinc (Bidwell, 1979) sobre el desarrollo de auxina endógena (AIA), por lo cual puede que una disminución en la concentración de zinc afecte también la concentración endógena de este regulador, manifestándose su deficiencia en diversos procesos fenológicos como la elongación de brotes.

Al igual que en el caso de la producción de brotes (número de brotes) existe la posibilidad de que la presencia de altas concentraciones de algunos minerales como el cobre y fósforo inhiban la utilización y absorción de otros elementos como el nitrógeno (Remage y Williams, 2002), hierro y calcio (Lee y De Fossard, citados por Ramaje y Williams 2002), afectando al mismo tiempo la elongación de los brotes.

Se sabe de la actividad que tienen las vitaminas como catalizadores de un sin número de procesos metabólicos dentro de la planta, sin embargo no se ha logrado detectar de que manera las vitaminas puedan afectar la elongación de los brotes, y si ha esto se le agrega el hecho de que el medio de bajo costo posee altas concentraciones de vitaminas, puede no ser estos nutrientes un aspecto determinante en el desarrollo de los brotes.

El gelificante sustituto (almidón de maíz) puede no ser un factor determinante en la elongación de brotes en el medio con sustitución de insumos, ya que algunos autores han evaluado este tipo de gelificante obteniendo

resultados similares a los obtenidos en un medio convencional (Puchoa *et al.*, 1999; Henderson y Kinnersley, 1988).

#### **5.4 Número de raíces**

Al cuantificar el número de raíces en explantes de plátano como respuesta a diferentes medios, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ). En donde el medio convencional obtuvo un rendimiento medio de  $1,93 \pm 1,33$  raíces, en comparación con el medio con sustitución de insumos con  $1,14 \pm 2,2$  raíces.

Es importante destacar la poca emergencia de raíces en ambos medios de cultivo. Lo cual se pudo deber a la presencia mayoritaria de citocinina exógena (BA), con el fin de promover la multiplicación de los explantes por medio de brotes, aumentando la relación citocinina : auxina (Skoog y Miller, 1954).

Generalmente uno de los aspectos que condiciona la utilización o no de un gelificante, así como de una concentración determinada del mismo; es la compactación que genere, ya que de este dependerá en buena medida la disponibilidad de nutrientes a que la planta tiene acceso y permitir el desarrollo de raíces.

Es posible que el gelificante utilizado en el medio con sustitución de insumos provee un adecuado nivel de solidificación, ya que este logró promover un número similar de raíces con respecto al medio convencional.

En lo que respecta a los otros nutrientes sustituidos (sales minerales y vitaminas) en el medio con sustitución de insumos, puede que no tuvieron un efecto diferenciador sobre el medio convencional en lo que a número de raíces se refiere, un aspecto importante a tomar en consideración para investigaciones posteriores en otras etapas de la micropropagación, como el enraizamiento.

#### **5.5 Longitud de las raíces**

La elongación de raíces, al igual que su regeneración esta relacionado con la presencia mayoritaria de auxinas (Skoog y Miller, 1954), por lo cual es de

esperar que en presencia de una alta proporción citocinina : auxina, no se manifieste el desarrollo rizogénico *in vitro*. Mas aún, si la presencia de citocinina exógena en el medio de cultivo, es igual para ambos tratamientos es posible que el desarrollo sea parecido para ambos.

Estas afirmaciones se basan en el hecho de la no existencia de diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los dos tratamientos evaluados, siendo sus medias de  $8,50 \pm 1,32$  mm para el medio convencional y  $9,92 \pm 1,67$  mm en el medio con sustitución de insumos.

La elongación de raíces está muy estrechamente relacionado con el grado de solidificación del sustrato en que la planta o explante se encuentre (Salisbury y Ross, 1992). Si se parte del hecho de que el medio convencional dispone de un nivel adecuado solidificación, y el medio con sustitución de insumos obtiene resultados similares a ese medio, se puede afirmar que el grado de solidificación ofrecido por el almidón de maíz, es óptimo para el desarrollo de raíces.

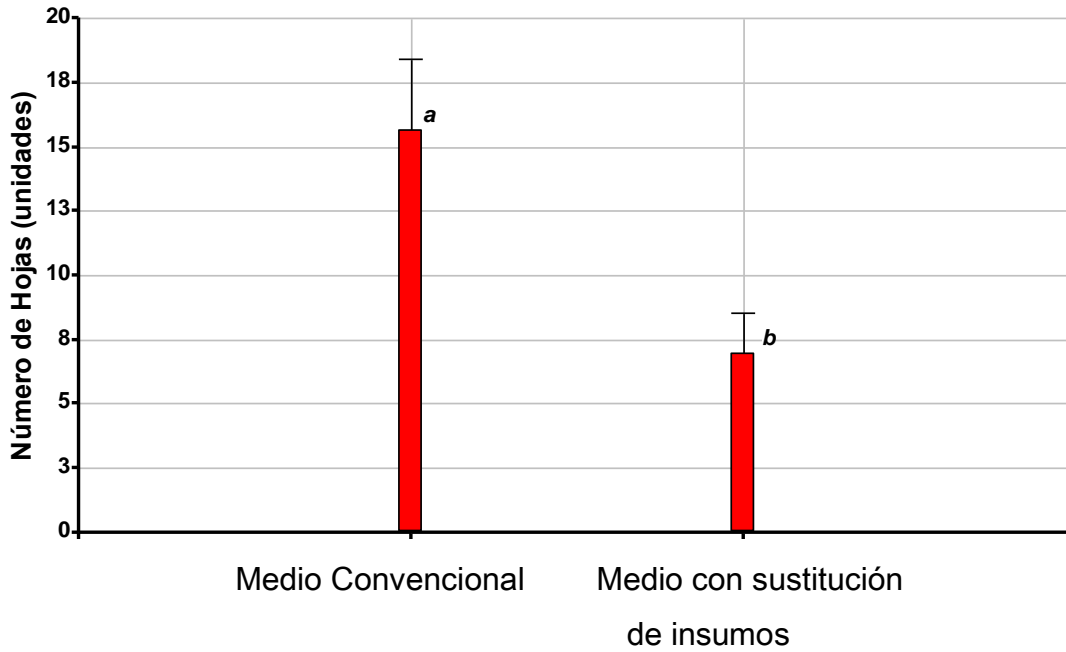
## **5.6 Número de hojas**

La evaluación del número de hojas, como respuesta a diferentes medios de cultivo fue altamente significativa ( $p < 0,01$ ). Siendo mayor en el medio convencional, con un número medio de  $15,63 \pm 2,75$  hojas y  $6,97 \pm 1,56$  hojas medio con sustitución de insumos (ver figura 8).

Esta alta diferencia entre el medio convencional y el de sustitución de insumos, se puede deber a que este último suministra una concentración deficiente de elementos esenciales para el desarrollo de estos órganos, como el nitrógeno y el potasio.

Los efectos de la baja presencia del potasio ha sido estudiado por autores como Lee y De Fossard, (citado por Ramaje y Williams, 2002), los cuales relacionan la no presencia de potasio con un menor número de hojas. En este caso, el medio con sustitución de insumos, presenta un 50% menos de este mineral con respecto al medio convencional, hecho que puede ser influyente en el poco desarrollo de estos órganos.





**Nota:** letras diferentes representan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Figura 8.** Número medio hojas emergidas, en un medio convencional y un medio con sustitución de insumos al cabo de ocho semanas de evaluación

Estos mismos autores, investigaron los efectos de la ausencia de ciertos minerales vitales para el desarrollo de los explantes a nivel *in vitro*, como el nitrógeno. El cual se logró identificar como agente inhibidor del desarrollo de hojas cuando su presencia fue nula en el medio de cultivo (Lee y De Fossard, citado por Remaje y Williams 2002). Hecho que pudo presentarse en el medio con sustitución de insumos, en donde la cantidad de nitrógeno elemental suministrado equivale a un 60% del brindado por el medio convencional (ver cuadro 2 ).

Es importante acotar que se observó una cierta clorosis en la mayoría de hojas de los explantes cultivados en el medio con sustitución de insumos en la punta de algunas de ellas, hecho que puede estar relacionado con la baja presencia de nitrógeno y hierro en el medio.

Otros minerales como el cobre y el zinc, pueda tengan efectos antagónicos sobre la emergencia de hojas, debido a la relación que estos tienen con otros nutrientes como el nitrógeno, el cual se puede verse impedida su

absorción por la alta presencia de cobre o baja presencia zinc en el sustrato, (Remaje y Williams, 2002) hecho presente en el medio con sustitución de insumos.

Un fenómeno que generalmente es observado a nivel de hojas y brotes es la hiperhidricidad (anteriormente llamado vitrificación), el cual está vinculado con deficiencias o altas concentraciones de ciertos minerales como Ca, NH<sub>4</sub> y K así como la baja solidificación del medio (Singha *et al.*,1990; Pasqualetto *et al.*, citado por Singha *et al.*,1990; Chacón *et al.*, 2000). Sin embargo, este hecho no fue observado en ninguno de los dos tratamientos evaluados, hecho particularmente importante principalmente para el medio con sustitución de insumos, ya que se convierte en una opción de uso para productores de recursos económicos limitados.

## 6. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se dan las siguientes conclusiones:

1. El porcentaje de supervivencia fue significativamente ( $p < 0,05$ ) similar entre los tratamientos evaluados.

2. La regeneración media de brotes fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en el medio convencional ( $6,14 \pm 1,54$  brotes), sobre el medio con sustitución de insumos ( $3,38 \pm 0,77$  brotes).

3. La longitud media de los brotes fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en el medio convencional ( $20,02 \pm 4$  mm), con respecto al medio con sustitución de insumos ( $12,39 \pm 3,9$  mm).

4. No existió diferencia significativa ( $p > 0,05$ ) en cuanto al número medio de raíces entre los dos tratamientos evaluados.

5. La longitud media de las raíces fue significativamente similar ( $p > 0,05$ ) entre el medio convencional y el medio con sustitución de insumos.

6. Existieron diferencias altamente significativas ( $p < 0,01$ ) entre los dos tratamientos evaluados, en lo que a número medio de hojas corresponde. En donde el medio convencional permitió una proliferación media de  $15,63 \pm 2,75$  hojas, contra  $6,97 \pm 1,56$  hojas del medio con sustitución de insumos.

## 7. RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones en las que se evalúen el efecto por separado de cada uno de los componentes del medio de cultivo sustituidos, que permita identificar con seguridad cual de ellos es el causal del bajo desarrollo de número de brotes, longitud de los mismos, así como número de hojas.
2. Utilizar fuentes solubles de sales minerales que pueden ser fácilmente obtenidas en el comercio de carácter agrícola y que son de bajo costo, las cuales brindan la facilidad de poder suministrar la cantidad de nutriente similar a las suministradas por el medio convencional.
3. Evaluar mezclas de almidón de maíz con otros gelificantes convencionales como agar o Bacto Agar<sup>®</sup>, etc, en diferentes proporciones, con el fin de bajar costos y mejorar las características.
4. Al inocular explantes en el medio con sustitución de insumos, se debe tener el cuidado de colocarlos superficialmente.
5. Realizar investigaciones en las que se evalúen dosis superiores de hasta 90 g l<sup>-1</sup> de almidón de maíz, con la finalidad de lograr una mayor consistencia .
6. Evaluar otros tipos de gelificantes como el *physillum*, alginato, gelatina o almidón de yuca.
7. Utilizar dosis de tabletas vitamínicas para consumo humano (Neurobine<sup>®</sup>) menores, ya que cada una de ellas posee concentraciones elevadas de vitaminas, lográndose disminuir aún más los costos del medio de cultivo.
8. Realizar este tipo de investigaciones a nivel de otras etapas de la micropropagación como introducción y enraizamiento; con el fin de establecer su efecto sobre los explantes, determinar el costo final de las plantas *in vitro* propagadas en medios con sustitución de insumos y evaluar el rendimiento de estas plantas a nivel de campo.

9. Se recomienda realizar análisis histológicos, que permita determinar con seguridad el proceso morfogénico ocurrido a nivel del explante.

## 8. LITERATURA CITADA

- Aguilar, M. 1993. **Micropropagación *in vitro* de plátano (*Musa AAB*) y costos del establecimiento en Laboratorio de la Sede regional San Carlos, ITCR.** Tesis Bach. Ing. Agr. Santa Clara, Costa Rica, ITCR. 40p.
- ASBANA (Asociación Bananera Nacional, CR). 1986. **Actividad bananera de Costa Rica entra en era de la biotecnología.** ASBANA 25(10): 28.
- Bhattacharya, P; Dey, S; Chandra, B. 1994. **Used of low-cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant tissue culture.** Plant Cell, Organ and Tissue Culture 37 (1): 15-23.
- Bidwell, R. 1993. **Fisiología vegetal.** Trad. G Jerónimo; M Rojas. 2 ed. México. AGT Editor S.A. 780 p.
- Brand, M. 1993. **Agar and ammonium nitrate influence hyperhydricity, tissue nitrate and total nitrogen content of serviceberry (*Amelanchier arborea*) shoots in vitro.** Plant Cell, Organ and Tissue Culture 35 (3): 203-209.
- Chacón, A; Saborío, F; Gómez, L; Torres, S, Valverde, R. 2000. **Efecto del tipo de gelificante en el desarrollo in vitro y la aclimatación de plantas de yampí (*Dioscorea trifida*) y ñame (*Dioscorea alata*).** Agronomía Costarricense 24 (2): 57-64.
- Elkonin, L y Pakahomova, N. 2000. **Influence of nitrogen and phosphorus on induction embryogenic callus of sorghum.** Plant Cell, Organ and Tissue Culture 61 (2): 115-123.
- Endress, R. 1994. **Plant cell biotechnology.** Berlín, Alemania, Springer-Verlag. 353p.
- Fisichella, M; Silvi, M; Morini, S. 2000. **Regeneration of somatic embryos and roots from quince leaves cultured on media with different microelement composition.** Plant Cell, Organ and Tissue Culture 63 (2): 101-107.
- Iraeli, Y; Labav, E; Reuveni, O. 1995. **Bananas and Plantains.** Growen, S. London, Chapman and Hall. 280 p.

- Murashige, T; Skoog, F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** Physiology Plant. 15: 473-497.
- Palma, T y Montero, W. 2002. **Curso de biotecnología orientada a la micropropagación de especies tropicales: curso impartido para profesores del Colegio Técnico Agrícola de Pital San Carlos.** San Carlos, Costa Rica. Editorial Tecnológica. 50 p.
- Murashige, T; Skoog, F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures.** Physiology Plant. 15: 473-497.
- Pierik, R. 1990. **Cultivo *in vitro* de las plantas superiores.** Tra. Mateo-Sagasta, L. 3 ed. España, Artes Gráficas Palermo, SL. 326 p.
- Remaje, C; Williams, R. 2002. **Mineral nutrition and plant morphogenesis.** In Vitro. Cell. Dev. Biol:38: 116-122.
- Reunión ACORBAT (7, 1996, Santo Domingo, Republica Dominicana). 1996. **Opportunities for biotechnology in the banana industry.** Bird, C. Santo Domingo, Republica Dominicana. 37-41 p.
- Roca, W; Mroginski, L. 1991. **Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones.** Cali, Colombia, CIAT. 969 p.
- Rodríguez, G; Morales, J; Chavaría, J. 1985. **Producción de Plátanos (*Musa AAB, ABB*).** Turrialba, Costa Rica, CATIE. 73P.
- Ross, C; Salisbury, F. 1994. **Fisiología vegetal.** Gonzáles, V, ME. 4 ed. México, Grupo Editorial Iberoamérica S.A. 756 p.
- Sandoval, J. 1986. **Micropropagación de musáceas.** ASBANA 9(24): 21-23.
- Sandoval, J. 2001. **Biología aplicada para la micropropagación de banano y plátano (*Musa AAA, AAB*).** Ed. Loría, S. Costa Rica , CORBANA. 30 p.
- Seiskandarajah, S; Skirvin, R; Abu-Gaoud, H. 1990. **The effect of some macronutrients on adventitious root on scion apple cultivars *in vitro*.** Plant Cell, Organ and Tissue Culture 21(2): 185-189.

SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria). 2002. **Boletín estadístico número 13**. San José, Costa Rica. SEPSA. 34 p.

Shimasaki, K; Uemoto, S. 1990. **Micropropagation of a terrestrial *Cymbidium* species using rhizomes developed from seeds and pseudobulbs**. Plant Cell, Organ and Tissue Culture 22(3): 237-244.

Singha, S; Townsend, E; Oberly, G. 1990. **Relationship between calcium and agar or verifcation and shoot tip necrosis of quince (*Cydonia oblonga* Mill) shoots *in vitro***. Plant Cell, Organ and Tissue Culture (Holanda), 23(2): 135-142.

Soto, M. 1992. **Bananos: cultivo y comercialización**. 2 ed. San José, Costa Rica. 649 p.

Symposia of the Society for Experimental Biology. 1957. **Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultures *in vitro***. Skoog, F; Miller, C. 11: 118-131.

Zaffari, G; Kerauy, G; Kraus, J; Romano, E. 2000. **Hormonal and histological studies related ton *in vitro* banana bud formation**. Plant Cell, Organ and Tissue Culture 63(2): 187-192.

Zimmerman, R; Bhardwaj, S; Fordham, I. 1995. **Use of starch gelled medium for tissue culture of some fruit crops**. Plant Cell, Organ and Tissue Culture 43(2): 207-213.



## 9. ANEXO

**Cuadro 1A.** Resultados de la Prueba T de grupos independientes para las variables: número de brotes, longitud de brotes, número de raíces, longitud de raíces, número de hojas y porcentaje de supervivencia.

Variable Evaluada	Medio Convencional		Medio con sustitución de insumos		Grados de			
	Media Aritmética	Varianza	Media Aritmética	Varianza	Valor T	Libertad	Valor P	Significancia
Número de Brotes (unidades)	6,14	2,36	3,38	0,59	3,21	6	0,018	**
Longitud de los brotes (mm)	20,02	20,03	12,39	3,4	3,15	6	0,02	**
Número de Raíces (unidades)	1,93	1,77	1,14	4,95	0,72	6	0,5	*
Longitud de las Raíces (mm)	8,5	1,32	7,92	1,67	0,14	6	0,892	*
Número de Hojas (unidades)	15,63	7,57	6,97	2,43	5,48	6	0,002	**
Porcentaje de Supervivencia	73,08 %	2,9	69,23 %	2,65	0,42	6	0,462	*

\* No existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ).

\*\* Existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Cuadro 2B.** Comparación del precio de los componentes del medio de cultivo convencional y con sustitución de insumos (US \$), al cabo de ocho semanas de micropropagación.

	<b>Medio Convencional</b>	<b>Medio con sustitución de insumos</b>
Macroelementos	0,46	0,02
Microelementos	0,01	0,01
Fe EDTA	1,79	1,79
Vitaminas	0,11	0,09
Regulador	3,84	3,84
Gelificante	1,02	0,30
Sacarosa	0,03	0,03
Agua	0,24	0,24
<b>Total</b>	<b>7,51</b>	<b>6,31</b>