



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**Efecto del fertilizante inorgánico Sulpomag y los aditivos orgánicos Caseína Hidrolizada y Agua de coco como sustitutos parciales en el medio de cultivo MS (1962) utilizado en la propagación clonal de *Musa sp.* var. Cavendish (banano, AAA) *in vitro***

**TESIS**

**Para optar el título de:**

**LICENCIADO EN BIOLOGIA**

**AREA BOTANICA**

**FRANK EDGARD MONTENEGRO JUAREZ**

**LAMBAYEQUE – PERU**

**2011**

**Efecto del fertilizante inorgánico Sulpomag y los aditivos orgánicos Caseína Hidrolizada y Agua de coco como sustitutos parciales en el medio de cultivo MS (1962) utilizado en la propagación clonal de *Musa sp.* var. Cavendish (banano, AAA) *in vitro***

TESIS

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

AREA DE BOTÁNICA

MSc. Consuelo Rojas Idrogo

PRESIDENTE

---

MSc. Josefa Ecurra Puícon

SECRETARIO

---

MSc. Ing. José Zeña Callacna

VOCAL

---

Dr. Guillermo Delgado Paredes

ASESOR

---

## **DEDICATORIA**

A mis queridos padres, ya que esta obra es fruto de sus nobles consejos, constante esfuerzo, mucha comprensión y apoyo moral, consiguiendo hacer realidad la culminación de mi carrera profesional.

## **AGRADECIMIENTOS**

Un agradecimiento en especial a mi patrocinador de tesis el Dr. Guillermo Delgado Paredes, por su tiempo y enseñanza prestada, para lograr la cristalización del presente trabajo de investigación.

Un sincero agradecimiento a la MSc. Consuelo Rojas Idrogo por sus orientaciones y apoyo profesional que hizo posible el concluir este trabajo de tesis.

Mi agradecimiento al Laboratorio de Biotecnología de la Asociación Chira por proporcionar el germoplasma de banano y en especial al Téc. David Quevedo Calle por su colaboración en la fase inicial del trabajo.

A mis amigos del Área de Botánica, con quienes he compartido momentos gratos e inolvidables.

# CONTENIDO

<b>I.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
<b>II.</b>	<b>REVISIÓN DE LA LITERATURA</b> .....	16
	2.1. Referente al banano como especie.....	16
	2.2. Referente al cultivo orgánico.....	16
	2.3. Referente al cultivo de banano <i>in vitro</i> .....	18
	2.4. Compuestos orgánicos en cultivo de tejidos.....	20
	2.5. Referente a los efectos nutricionales de las plantas <i>in vitro</i> .....	21
	2.6. Referente a los efectos nutricionales del banano en campo.....	23
	2.7. Característica del fertilizante ensayado .....	23
<b>III.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	25
	<b>3.1. Material</b> .....	25
	<b>3.1.1. Material botánico</b> .....	25
	<b>3.1.2. Medios de cultivo</b> .....	25
	A. Formulación y preparación del medio de cultivo de uso convencional en banano.....	25
	B. Formulación y preparación del medio de cultivo en experimentación.....	27
	<b>3.2. METODOLOGÍA</b> .....	29

<b>3.2.1. Procedimiento seguido en cultivo de tejidos</b> .....	29
A. Inducción de múltiples brotes.....	29
B. Enraizamiento de brotes.....	30
C. Transferencia a suelo .....	30
<b>3.2.2. Procedimiento seguido en la evaluación y análisis estadístico</b> .....	31
A. Modelo de evaluación.....	31
B. Análisis estadístico.....	32
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	33
<b>4.1. Inducción de múltiples brotes</b> .....	33
a. Número de brotes.....	34
b. Longitud de brotes.....	38
c. Plantas normales (Aspectos morfológicos de los brotes).....	41
<b>4.2. Enraizamiento de brotes</b> .....	43
a. Altura de plantas enraizadas.....	43
b. Tasa de crecimiento.....	45
c. Número de raíces.....	46
d. Tamaño de raíces.....	47
e. Peso fresco.....	49
f. Brotamiento.....	50
<b>4.3. Transferencia a suelo</b> .....	53

<b>V. CONCLUSIONES</b> .....	55
<b>VI. RECOMENDACIONES</b> .....	56
<b>VII. RESUMEN</b> .....	57
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	58
<b>IX. ANEXOS</b> .....	64

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Composición química del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962).....	
26	
<b>Cuadro 2.</b> Composición del medio de cultivo, utilizado en la propagación clonal <i>in vitro</i> de banano ( <i>Musa sp.</i> var. Cavendish).....	
26	
<b>Cuadro 3.</b> Tratamientos ensayados en el estudio del efecto del fertilizante orgánico Sulpomag y las fuentes nitrogenadas orgánicas (CH y AC) en el cultivo de tejidos <i>in vitro</i> de banano ( <i>Musa sp.</i> var. Cavendish).....	28
<b>Cuadro 4.</b> Medias del número de brotes de <i>Musa sp.</i> var. Cavendish cultivadas en el medio de cultivo de inducción de múltiples brotes <i>in vitro</i> , a 30 y 60 días de incubación.....	35
<b>Cuadro 5.</b> Medias de la altura de brotes de <i>Musa sp.</i> var. Cavendish cultivadas en el medio de cultivo de inducción de múltiples brotes <i>in vitro</i> , a 30 y 60 días de incubación.....	40
<b>Cuadro 6.</b> Medias de todas las variables evaluadas en el medio de cultivo de enraizamiento para <i>Musa sp.</i> var. Cavendish, a 30 días de incubación.....	44



## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** A) Contaminación bacteriana (*Bacillus spp*) presente en la etapa de multiplicación de banano (*Musa sp.* var. Cavendish). B) Oscurecimiento del medio de cultivo y necrosis total de las plantas *in vitro* por la acción de *Bacillus spp*. .....  
34
- Figura 2.** Comparación del número de brotes de *Musa sp.* var. Cavendish entre los diferentes tratamientos ensayados a 30 y 60 días de cultivo.....  
36
- Figura 3.** Brotación múltiple observados en explantes de *Musa sp.* var. Cavendish en fase de multiplicación. **A.** Tratamiento control (T0) después de 60 días de incubación, **B.** Tratamiento T5, después de 60 días de incubación.....  
38
- Figura 4.** Comparación de la altura de brotes de *Musa sp.* var. Cavendish entre los diferentes tratamientos ensayados a 30 y 60 días de cultivo.....  
40
- Figura 5.** Brotes de *Musa sp.* var. Cavendish normales en los diferentes tratamientos ensayados, a 60 días de incubación.....  
41
- Figura 6.** Comparación de plantas sanas observados en brotes de *Musa sp.* var. Cavendish en fase de brotamiento múltiple después de 60 días de cultivo. **A.** Tratamiento control (T0), **B.** Tratamiento T6.....  
42
- Figura 7.** Altura de planta observada en *Musa sp.* var. Cavendish en fase de enraizamiento. Tratamiento T0, después de 30 días de incubación.....  
44

<b>Figura 8.</b> Crecimiento de plantas de banano ( <i>Musa sp.</i> var. Cavendish) en medio de cultivo de enraizamiento <i>in vitro</i> , a 30 días de incubación.....	45
<b>Figura 9.</b> Número y tamaño de raíces observadas en <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en fase de enraizamiento. Tratamiento T3, después de 30 días de incubación.....	48
<b>Figura 10.</b> Comparación entre la altura y el peso de plantas de <i>Musa sp.</i> var. Cavendish entre los diferentes tratamientos ensayados.....	50
<b>Figura 11.</b> Brotamiento en la fase de enraizamiento en los diferentes tratamientos ensayados.....	51
<b>Figura 12.</b> Brotamiento observado en <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en fase de enraizamiento. Tratamiento T5, después de 30 días de incubación.....	51
<b>Figura 13.</b> Aclimatación de plantas de banano ( <i>Musas sp.</i> var Cavendish) en invernadero...	54

## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Formulación de los diferentes medios de cultivos ensayados.....	64
<b>ANEXO 2.</b> Análisis de varianza para el número de brotes de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish a 30 días del brotamiento <i>in vitro</i> .....	67
<b>ANEXO 3.</b> Prueba de Duncan para el número de brotes de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish a 30 días del brotamiento <i>in vitro</i> .....	67
<b>ANEXO 4.</b> Análisis de varianza para el número de brotes de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish a 60 días del brotamiento <i>in vitro</i> .....	68
<b>ANEXO 5.</b> Prueba de Duncan para el número de brotes de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish a 60 días del brotamiento <i>in vitro</i> .....	68
<b>ANEXO 6.</b> Análisis de varianza para la altura de brotes de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish a 30 días del brotamiento <i>in vitro</i> .....	69
<b>ANEXO 7.</b> Prueba de Duncan para el número de brotes de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish a 30 días del brotamiento <i>in vitro</i> .....	69
<b>ANEXO 8.</b> Análisis de varianza para la altura de brotes de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish a 60 días del brotamiento <i>in vitro</i> .....	70
<b>ANEXO 9.</b> Prueba de Duncan para la altura de brotes de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish a 60 días del brotamiento <i>in vitro</i> .....	70
<b>ANEXO 10.</b> Análisis de varianza para la altura final de las plantas de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	71

<b>ANEXO 11.</b> Prueba de Duncan para la altura final de las plantas de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	71
<b>ANEXO 12.</b> Análisis de varianza para la tasa de crecimiento de las plantas de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	72
<b>ANEXO 13.</b> Prueba de Duncan para la tasa de crecimiento de las plantas de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	72
<b>ANEXO 14.</b> Análisis de varianza para el número de raíces de las plantas de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	73
<b>ANEXO 15.</b> Prueba de Duncan para el número de raíces de las plantas de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	73
<b>ANEXO 16.</b> Análisis de varianza para el tamaño de raíces de las plantas de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	74
<b>ANEXO 17.</b> Prueba de Duncan para el tamaño de raíces de las plantas de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	74
<b>ANEXO 18.</b> Análisis de varianza para el peso fresco de las plantas de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	75
<b>ANEXO 19.</b> Prueba de Duncan para el tamaño de raíces de las plantas de banano <i>Musa sp.</i> var. Cavendish en la fase de enraizamiento <i>in vitro</i> .....	75
<b>ANEXO 20.</b> Esquema proporcionado por la Dra. Daymi Carranza, presentado en su trabajo de investigación; <i>Bacillus subtilis</i> , <b>contaminante bacteriano en la micropropagación de bananos (cv. FHIA-18, AAAB)</b> .....	76

<b>ANEXO 21.</b> Observación Microscópica del aislado bacteriano; <b>A.</b> Colonias bacilares Gram positivas, <b>B.</b> Presencia de endosporas.....	76
<b>ANEXO 22.</b> Algunos componentes orgánicos del agua de coco (AC) (Krikorian, 1991)....	77
<b>ANEXO 23.</b> Componentes nitrogenados de la caseína hidrolizada <sup>a</sup> con ácidos y con enzimas (Krikorian, 1991).....	78

## I. INTRODUCCIÓN

La producción orgánica en el mundo viene creciendo aceleradamente a una tasa promedio de 15%. La búsqueda de alimentos sanos, la preocupación por los cultivos transgénicos y por el daño al medio ambiente han contribuido al crecimiento de la demanda de estos productos en los últimos años. A nivel mundial, en el 2006, se estimaba una superficie agrícola de 31 millones de hectáreas, siendo Australia el país con más área sembrada (42%), seguido por Europa (21%), América Latina (20%), Asia (13%), Norteamérica (4 %) y África (3 %).

En el Perú, el desarrollo de cultivos orgánicos es una tradición ancestral basada en la gran diversidad de especies de plantas y animales; en los últimos 12 años el área sembrada de estos cultivos se ha multiplicado 6 veces, al pasar de 44 mil ha en 1995 a aproximadamente 300 mil ha en 2007. Una creciente demanda hace más rentable el producto orgánico, llegando a cotizarse en promedio de 30 a 40% más que los productos convencionales. La importancia de nuestro país en el panorama mundial es cada vez mayor, lo que puede apreciarse por los cerca de 35,000 productores orgánicos certificados, lo que nos coloca en el séptimo lugar en número de productores, después de México, Italia, Uganda, Tanzania, Filipinas y Sri Lanka. Alrededor del 95% de la producción orgánica nacional se exporta, y el resto se destina al mercado nacional, principalmente para su venta en supermercados. Así, las ventas al exterior llegaron a US\$161.32 millones en 2007, un incremento de 52% con respecto a lo exportado el año anterior. Destacaron productos como el café, el banano, el cacao y el algodón, que concentraron el 96% de lo exportado; el 4% restante lo conformó una diversidad de productos que se producen y exportan en montos menores, pero crecientes (quinua, pecana, mango, kiwicha, etc.). En el Perú, el 55% de las exportaciones tienen como destino Europa, el 40% América y el 3% Asia. El Ministerio de Agricultura informó que las exportaciones en el 2008 de banano orgánico, procedentes en su totalidad del norte del país, aumentaron de una manera excepcional en los últimos cinco años ubicando al Perú como el primer exportador mundial de dicho producto, seguido por República Dominicana.

El banano, plátano o cambur (*Musa spp.*) es una especie perteneciente a la familia Musaceae, una de las mejor caracterizadas dentro de las monocotiledóneas. Genéticamente, las variedades comerciales que hoy día se cultivan, han derivado de las especies silvestres *Musa*

*acuminata* de genoma AA y *Musa balbisiana* de genoma BB, ambas con un número de cromosomas  $2n = 22$ . De ellas han sido reconocidas como hibridaciones naturales a través del tiempo, las variedades diploides AB, las triploides AAA, AAB, ABB y las tetraploides AAAA, AAAB, AABB Y ABBB, resultando las más importantes desde el punto de vista comercial el grupo triploide AAA que están conformadas por clones estériles y partenocárpicos. Conforman la fruta intertropical más consumida del mundo. Se trata de una falsa baya, de forma falcada o elongada, que crece en racimos de hasta cien unidades y 50 kg de peso; de color amarillo cuando está maduro, es dulce y carnoso, rico en carbohidratos, potasio, vitamina A y vitamina C.

Se cultivan en más de 130 países, desde el sudeste asiático de donde son nativas, hasta Oceanía y Sudamérica; el principal productor mundial es la India, de donde proceden casi un cuarto de los frutos comercializados en el mundo, aunque buena parte de los mismos son para consumo doméstico. El volumen de producción de bananas y plátanos sólo es superado por el trigo (*Triticum spp.*), el arroz (*Oryza sativa*) y el maíz (*Zea mays*). El Perú tiene cultivadas 129 566 ha. de banano junto a otras variedades de musáceas tales como; plátano, manzanito, plátano de la isla, orito, 4 filos o zapatito, seda, monte cristo o filipino, etc.

La producción de banano es continua a lo largo de todo el año. La utilización del plátano y banano como alimento ha ido incrementando su valor, lo que implica la necesidad de mejorar sus rendimientos, calidad y fomentar su rápida multiplicación mediante la generación y/o mejoramiento de tecnologías. Complementariamente sabemos que la eficiencia del sistema de propagación de banano en campo expresada a través de la tasa de propagación de hijuelos no satisface la real demanda que existe, estimándose que la producción de hijos por una hectárea puede proveer “semillas” para sembrar una superficie entre 1000 a 2500 m<sup>2</sup>; además, existe el riesgo de diseminación de plagas y enfermedades.

En los últimos años la Biotecnología de Plantas ha desarrollado numerosas técnicas con el propósito de resolver los diversos problemas que plantea la agricultura moderna. La técnica del cultivo de tejidos constituye una de las aplicaciones prácticas más importantes de la biotecnología para la obtención de grandes volúmenes de material vegetal de propagación de plátanos y bananos libre de plagas y enfermedades fúngicas y bacterianas, así como la

conservación e intercambio de germoplasma constituyen importantes aplicaciones de esta técnica. Además, se puede multiplicar rápidamente genotipos de gran importancia económica en áreas relativamente pequeñas, lo que ha permitido tener poblaciones uniformes con un alto rendimiento por hectárea; sin embargo, si bien esta técnica puede resolver el problema de semilla, los componentes químicos que constituyen el medio de cultivo tales como nitrato de amonio y nitrato de potasio no están permitidos por la agricultura orgánica, por lo cual no cumplen los estándares para poder ser consideradas como medios de cultivos orgánicos. De este modo las plantas generadas por cultivos de tejidos y llevadas a campo tampoco son incluidas dentro del contexto “orgánico”. Existen en el mercado algunos fertilizantes inorgánicos que no están restringidos por la agricultura orgánica tales como el Sulpomag, Aurosoma, Kinetex, como fuentes de sales: potasio, fósforo, azufre, magnesio, calcio, manganeso entre otros, que bien podrían sustituir a las sales mayores.

Es por ello que el objetivo del presente trabajo fue buscar un sustituto adecuado de las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962) específicamente que reemplace las concentraciones de nitrógeno en forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  y  $\text{KNO}_3$ , que para el caso fueron considerados productos orgánicos como el Agua de coco y Caseína hidrolizada, además del fertilizante inorgánico Sulpomag como fuente de sales mayores y de esta manera las plantas de *Musa sp.* var. Cavendish (banano, AAA) producidas en estos medios de cultivo, formulados con estos componentes, sean reconocidas como plantas de banano orgánico.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Referente al banano como especie

Los plátanos y bananos representan gran parte de la alimentación diaria para más de 400 millones de personas en más de 100 países del trópico y subtropical. La utilización del plátano y banano como alimento ha venido incrementando su valor económico, lo que implica la necesidad de mejorar sus rendimientos, calidad y fomentar su rápida multiplicación mediante el desarrollo y transformación de tecnologías (Ortiz, 1993)

Esta planta perenne de consistencia herbácea, miembro de las Musaceas, está integrada por 2 géneros y unas 42 especies propias de las regiones tropicales de ambos hemisferios; solo el género tipo con 3 especies están presentes en la flora peruana, todas cultivadas (Llatas, 2005). Su propagación comercial es por el corte de potenciales propágulos a partir del rizoma pero también a través de los "chupones o hijuelos" que brotan de él junto al pseudotallo principal.

El banano moderno es un cultígeno, probablemente originario de la región indomalaya. Desde Indonesia se propagaron hacia el sur y el oeste, alcanzando Hawaii y la Polinesia por etapas. Los comerciantes europeos llevaron noticias de esta planta a Europa alrededor del siglo III a. C., pero no lo introdujeron hasta el siglo X. De las plantaciones de África Occidental los colonizadores portugueses lo llevarían a Sudamérica en el siglo XVI.

Hoy las variedades comerciales se cultivan en todas las regiones tropicales del mundo. Es la más cultivada de las frutas tropicales y una de las cuatro más importantes en términos globales, sólo por detrás de la uva (*Vitis vinifera*), los cítricos y la manzana (*Malus domestica*). Anualmente se producen más de 28 millones de toneladas de esta fruta, de las cuales casi dos tercios provienen de Sudamérica. Los principales importadores son Europa, los Estados Unidos, Japón y Canadá. Brasil es el principal productor mundial de banana, con alrededor de 3 millones de toneladas anuales, destinadas en su mayoría al mercado interno.

### 2.2 Referente al cultivo orgánico

La producción orgánica en el mundo viene creciendo aceleradamente por la búsqueda de alimentos sanos, la preocupación por los cultivos transgénicos y por el daño al medio

ambiente han contribuido al crecimiento de la demanda de estos productos. El Perú es uno de los países con un gran desarrollo en estos últimos años con respecto a la agricultura orgánica, destacando productos como el café, el banano, el cacao y el algodón. En 2007 se exportó a EE.UU. por valor de US\$54.5 millones (34% del total exportado), concentrando el café 76% de las ventas, el banano 15% y el cacao 2%. Siendo el banano orgánico el producto ubicado en el segundo lugar de exportación con 19% siendo los principales países importadores EE.UU., Alemania y Holanda. Pero el mercado externo exige contar con un certificado otorgado por instituciones especializadas y que garantice que la producción se ajusta a normas técnicas y buenas prácticas agrícolas; así, se debe garantizar, por ejemplo, que el producto está libre de químicos. El problema es que la mayoría de cultivos orgánicos pertenecen a pequeños productores que no cuentan con los recursos necesarios para afrontar los altos costos de la certificación (AGRODATA, 2008).

Las exportaciones peruanas de banano orgánico, procedentes en su totalidad del norte del país, aumentaron de una manera excepcional en los últimos cinco años ubicando a Perú como el primer exportador mundial de dicho producto en el año 2008, con 45.5 millones de dólares, informó el Ministerio de Agricultura. Este elevado y sostenido crecimiento de las exportaciones peruanas de banano orgánico es resultado de la altísima calidad de dicho producto y de la mayor prioridad en el consumo de productos orgánicos en los países del hemisferio norte. En el primer bimestre del 2009 el valor de las exportaciones de esta fruta fue de 9.3 millones de dólares, 35 % más respecto al mismo período del 2008, mientras que en términos de volumen aumentó 12 % al sumar 15,000 TM. Para fines del 2009 deberían incrementarse en 20 % y bordear los 55 millones de dólares, unas 94,000 TM, lo cual es un estimado conservador.

En base a los indicadores económicos de exportación (AGRODATA, 2008) y a las condiciones agroecológicas óptimas para este cultivo, nuestro país tiene una evidente ventaja competitiva. Las variedades de bananos y plátanos comerciales, más utilizados en la actualidad no producen semillas fértiles (triploides estériles), por lo que su propagación es asexual, utilizando como material vegetativo cormos de los brotes laterales o "hijos " de la planta. Este sistema de propagación clonal es lento (3 a 5 brotes por ciclo en una plantación comercial). Además, este sistema permite la diseminación de enfermedades y plagas a los nuevos cultivos. Un ejemplo de esto es la Sigatoka negra (*Micospharella fijiensis* Morelet),

considerada como una de las responsables de la gran pérdida en la producción de bananos a nivel mundial a partir de los años 60 (Sepúlveda et al, 2008); además, de ciertas bacterias y virus como el mosaico del pepino (CMV) que produce clorosis infecciosa y podredumbre del corazón. Recientemente, se han reportado nuevos problemas fitopatológicos en el cultivo de banano como son el ataque de nemátodos y de insectos diversos, por lo general coleópteros, que afectan los rizomas y el sistema radicular (Portero, 1991). Es por eso que el uso de las técnicas de cultivo de tejidos en la micropropagación clonal *in vitro* de musáceas, ha permitido la producción masiva de plantas sanas, libres de hongos, nemátodos, bacterias y además, la multiplicación rápida de genotipos de gran importancia económica en áreas relativamente pequeñas ha permitido tener poblaciones uniformes con alto rendimiento por hectárea. (Canchignia et al., 2007).

### **2.3. Referente al cultivo de banano in vitro**

El cultivo de tejidos puede definirse como un conjunto de técnicas que permiten el desarrollo de cultivos de órganos, tejidos, células y protoplasmas en condiciones asépticas empleando medios nutritivos artificiales. La multiplicación de plantas a través de las técnicas de cultivo *in vitro* se ha convertido en una herramienta indispensable en la agricultura moderna. Gran parte de este éxito se debe al desarrollo, a partir de la década de 1950, de medios de cultivo con altos contenidos de sales minerales y en particular de amonio (Vasil, 2008). Si bien se considera que existen 13 elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, la determinación de los niveles óptimos es compleja (Niedz y Evens 2007). En 1962, Toshio Murashige y Folke Skoog desarrollaron, basándose en el contenido de compuestos inorgánicos de las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Wisconsin 38), un medio de cultivo que permitió el crecimiento y desarrollo satisfactorios de callos de tabaco. Luego de su publicación (Murashige y Skoog 1962), este medio, conocido como MS empezó a ser utilizado extensivamente en una gran cantidad de especies vegetales, a veces muy distantes taxonómicamente del tabaco, y en una gran diversidad de estructuras vegetales. Gran parte del éxito de este medio, se debe a los niveles altos en sales de amonio, fosfato y de potasio; los cuales han probado ser críticos en los procesos organogénicos de la mayoría de especies estudiadas (Pierik 1990, Azofeifa 2008).

En la actualidad, el MS es el medio de cultivo más utilizado para el cultivo *in vitro* de plantas, esto es porque aunque no contiene necesariamente las cantidades óptimas para todos los explantes, de las diversas especies en que se emplea, la mayoría presentarán cierto grado de crecimiento, lo que representa un punto de partida (Niedz y Evens 2007).

Los primeros trabajos de banano en cultivo de tejidos fueron realizados a comienzos de la década del 60 por Cox et al, quienes cultivaron embriones somáticos de *Musa balbisiana* con escaso éxito. Quince años después, Rowe y Richardson (1975) realizaron un trabajo similar sin obtener mejores resultados. En ambos trabajos el objetivo fue inducir el crecimiento de brotes y raíces a partir de los embriones escindidos de semillas. Sin embargo, desde hace tres décadas, se emplean las técnicas *in vitro* para el saneamiento y propagación clonal de musáceas. Las técnicas comerciales de micropropagación de bananos y plátanos hacen parte de la modernización de la agricultura en muchos países y han contribuido a mejorar las condiciones sanitarias de las plantaciones e incrementar su productividad. Los primeros trabajos sobre el establecimiento del protocolo de micropropagación de musáceas se informaron en 1972 (Ma y Shii, 1972, 1974); a partir de estos se han cultivado gran número de variedades y clones *in vitro* del género *Musa sp.* por investigadores en distintas partes del mundo como Guzmán (1975); Bower (1982); Cronauer y Krikorian (1984); George, (1996) y Castro et al. (2002). Por lo general en todos estos trabajos se observó la formación de plantas completas, desde solo una de ellas a numerosas (Clusters) a partir de un ápice o meristemas. Así mismo Broomes 1990 y Balakrishnamurthy y Sreerangaswamy (1990) siguiendo este mismo protocolo y utilizando ápices lograron obtener altos porcentajes en la multiplicación de plantas demostrando así el gran potencial de estos tejidos. Adicionalmente, cabe destacarse el trabajo de Berg y Bustamante (1974) quienes utilizaron el cultivo de meristemas para obtener plantas de la variedad Cavendish (AAA) saneados del virus del mosaico del pepino (CMV) y el trabajo de Navberjee y Langhe (1985), que desarrollaron un protocolo para conservar *in vitro* germoplasma de bananos y plátanos por limitación del crecimiento a tasas mínimas. Sin embargo, la aplicación de técnicas biotecnológicas del cultivo de tejidos *in vitro* no es reconocida como una técnica aplicable para la agricultura orgánica la cual se fundamenta en la incorporación de sales minerales no permitidas, limitando así la obtención de semillas asépticas y consecuentemente la posibilidad de usar la biotecnología como una herramienta para aumentar los niveles de producción (Reglamento Técnico para los Productos Orgánicos,

2006). Adicionalmente, se ha buscado sustituir completamente las soluciones nutritivas por otras con menor contenido de nutrimentos. Un ejemplo lo presentan Ganapathi et al. (1995), quienes lograron propagar banano, con un éxito limitado, al sustituir las sales de MS por las de Knop, mucho más pobres en elementos minerales.

## **2.4 Compuestos orgánicos en cultivo de tejidos**

Una de las variantes dentro del cultivo *in vitro* es la adicción de compuestos orgánicos al medio de cultivo basal (Pierick 1990, Moreno y Menchaca 2007). Uno de los primeros trabajos en utilizar agua de coco fue realizado en 1942 por Van Overbeek, Conklin y Blackeslee, los cuales mostraron que los embriones en desarrollo de *Datura* se podían cultivar *in vitro* hasta su madurez, utilizando el endospermo líquido del coco (*Coco nucifera*) como suplemento. Rápidamente aparecieron otros usos de agua de coco (citados por Ball, 1946).

En 1948, Caplin y Steward se dieron cuenta del potencial del agua de coco para inducir la división celular en tejidos diferenciados. Pensaron que al ser nutritivo para los embriones podía producir el mismo efecto en tejidos y en células. Un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular de explantes fue la observación de que el agua de coco, a niveles relativamente bajos (5 - 20 % v/v), podía interactuar con las auxinas y promover el crecimiento, en situaciones que por sí solas era ineficiente. Una gran parte de los trabajos realizados sobre cultivo de tejidos ha girado alrededor del uso del agua de coco (AC) en presencia o ausencia de AIA, ANA o 2,4-D. En caso de los tejidos recalcitrantes, se debería ensayar también una amplia gama de otros compuestos conocidos por sus propiedades estimuladoras del crecimiento (Pérez, 1998).

En la multiplicación de bananos del cv. Williams (AAA) en medios de cultivo con 1,5 mg/L de 6-benziladenina (BA) suplementado con 20% de agua de coco, se lograron índices de multiplicación similares a los obtenidos en medios de cultivo con el doble de la concentración de BA (2,5 mg/L). Esto muestra que el agua de coco podría suplementar e inclusive sustituir al BA para la inducción de brotes. Sin embargo, los autores de esta investigación sugieren que estos experimentos deben continuarse y evaluar el índice de brotes adventicios y su incidencia en la variación somaclonal. (Colmenares y Giménez, 2003).

Además, una de las ventajas de agregar los compuestos orgánicos al medio de cultivo es su bajo costo comparado con el de los reguladores de crecimiento como las auxinas y citocininas. Otro factor importante observado con la adición de compuestos orgánicos es el

aumento porcentual de la sobrevivencia *ex vitro*, una de las etapas más difíciles después del cultivo *in vitro* (Moreno y Menchaca, 2007).

No se ha podido encontrar literatura donde se hayan realizado trabajos en cuanto a la modificación de las principales sales minerales en los medios de cultivos por productos orgánicos. Se han reportado estudios de incorporación de fuentes orgánicas pero no la sustitución parcial o completa de éstas por las sales presentes en el medio de cultivo; razón por la cual en el presente trabajo se formulará un medio de cultivo con los niveles de constituyentes químicos permitidos entre los cuales se ha considerado el fertilizante inorgánico Sulpomag como fuente de Potasio, Azufre y Magnesio, además de un complemento de nitrógeno orgánico en forma de Caseína hidrolizada y Agua de coco.

## **2.5 Referente a los efectos nutricionales de las plantas *in vitro***

Los primeros estudios en los cultivos de agua fueron realizados en 1699 por Woodward en papa (*Solanum tuberosum*), arveja (*Vicia sp.*) y menta (*Mentha sp.*), en agua de diferentes orígenes: agua de lluvia, agua de río, agua de manantial y agua destilada, demostraron que ella funciona como portadora de material terrestre. En 1804, Saussure hizo ensayos para analizar factores involucrados en el cultivo nutritivo de las plantas, sembrando *Bidens cannavina* y *Polygonum persicaria* en agua destilada y en soluciones de sales diluidas, quedando establecidas la necesidad de proveer nitrato en la solución de cultivo, comportándose las raíces como no selectivas en el ascenso de compuestos benéficos y tóxicos y que dichas sales podrían ser absorbidas desde soluciones muy diluidas. Desde entonces muchos investigadores han hecho aportes significativos al respecto, pero la base técnica y científica fue dada por Arnon y Stotut en 1939, y Arnon en 1950 con la introducción de los “criterios de esenciabilidad” de ciertos elementos involucrados en la nutrición (Sosa, 1991).

En lo referente a cultivo de tejidos, su éxito está íntimamente relacionado a la naturaleza del medio de cultivo utilizado. En efecto, el crecimiento vigoroso de las plantas necesita tomar del suelo cantidades relativamente grandes de algunos iones inorgánicos (principalmente sales de nitrógeno, potasio, fosforo, calcio, magnesio y azufre) y en pequeñas cantidades otros iones (sales de fierro, zinc, boro, cobre, molibdeno y cobalto), siendo necesario suplementar con carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, reguladores de crecimiento y agentes solidificantes dependiendo de la finalidad del cultivo. Los adelantos más significativos en el proceso de formulación básica involucran la introducción de nitrógeno, junto con la

concentración más alta del ion  $\text{NO}_3^-$  y el ion  $\text{K}^+$ . En 1922 Knudson descubrió que las semillas de orquídeas germinaban *in vitro* en medios de cultivos conteniendo 16 mM de iones de  $\text{NH}_4$  en adicción a 8.5 mM de iones de  $\text{NO}_3^-$ . Nitsch y Nitsch en 1956 fueron los primeros en usar iones  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{K}^+$  en estudios sobre cultivo de tejidos de girasoles jerusalem, concluyendo que  $\text{NH}_4$  fue un tanto indeseable, produciendo el cloruro de amonio un crecimiento reducido al efecto inhibitorio de los iones de amonio; sin embargo, Skoog desarrolló una serie de medios de cultivo para tabaco demostrando que el ion amonio era benéfico por lo cual incremento progresivamente la concentración de nitrógeno total.

El trabajo realizado en tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Wisconsin 38) por Murashige y Skoog (1962), con la finalidad de revisar un medio de cultivo para crecimiento rápido, estableció que 40 mM de nitrógeno como  $\text{NO}_3^-$  y 20 mM de nitrógeno como  $\text{NH}_4^+$  resultaron óptimos no obstante incrementarse cinco veces el nitrógeno respecto al medio de cultivo de White (1943). Se incrementó, asimismo el potasio aproximadamente onces veces (20 mM) y el fosforo tres veces (1.25 mM). Los otros macronutrientes también fueron incrementados pero en niveles más inferiores. Este medio de cultivo MS, ha resultado ser eficiente para la micropropagación de muchas especies e incluso como medio de cultivo básico modificado, puesto que soluciones diluidas han demostrado ser mejores en algunas circunstancias.

Kirby et al. (1987) reportaron una recopilación de estudios referentes a la nutrición de nitrógeno ya sea como nitrato, amonio o urea, resultando un elemento nutritivo primario limitante del crecimiento de todas las plantas. Sin embargo, en experimentos realizados en especies leñosas, la formulación del medio de cultivo MS, rica en nitrógeno, no ayudó al buen crecimiento *in vitro*, especulándose como causa el balance de la concentración iónica total de este elemento. No obstante, la contribución de los nutrientes en una mejor forma son los macroelementos, en particular fuentes de nitrógeno y potasio, de allí que cualquier reducción principal de la concentración iónica en un medio de cultivo debe involucrar necesariamente ajustes en los niveles de nitrógeno y potasio.

Williams et al. (1990) investigaron la relación entre la composición del tejido, del medio de cultivo y el proceso de absorción de los minerales en las plantas *in vitro*, resultando esta absorción proporcional a la concentración del medio de cultivo con las concentraciones relativas de nutrientes individuales mantenidos. Combinando la concentración de nutrientes individuales en el medio de cultivo, aumento la concentración relativa de ese nutriente en el tejido de las plantas. Dicha respuesta fue comparable con plantas cultivadas *ex vitro*.

## **2.6 Referente a los efectos nutricionales del banano en campo**

Los bananos toleran bien una gran variedad de terrenos; crecen y fructifican en condiciones de bastante pobreza, aunque para que la producción sea económicamente rentable requieren suelos fértiles y húmedos. Prefieren terrenos profundos, bien drenados, con la capa freática a no menos de dos metros de profundidad, para evitar el anegamiento de las raíces. Prefieren suelos ligeramente ácidos, con un pH en torno al 6.

Los requerimientos nutritivos del banano son elevados; las variedades de fruta pueden necesitar entre 250 y 600 kg de nitrógeno por hectárea para proporcionar rendimientos comerciales, y entre 700 y 800 kg de potasio. Un exceso de salinidad no detiene el crecimiento de la planta, pero reduce marcadamente su rendimiento, dando lugar a frutos enanos o muy delgados.

Se estima que una cosecha de unas 12 toneladas por hectárea exige del suelo unos 25 kg. de nitrógeno, 4,5 kg de fósforo, 62 kg de potasio y unos 8 kg de calcio. La proporción de abono empleado va de 3:1:6 a 8:10:8 NPK de acuerdo a las características del suelo; la cantidad dependerá de la densidad de población, pero estará en torno a 1-1,5 toneladas por hectárea en un ciclo, incluyendo 50-150 kg de nitrógeno, 15-60 kg de fósforo y 80-180 kg de potasio.

## **2.7 Característica del fertilizante ensayado**

SULPOMAG es el fertilizante que aporta tres nutrientes: potasio, magnesio y azufre, todos en forma inmediatamente asimilable por la planta. Tiene aspecto de cristales simples de K para aplicación directa al suelo.

A pesar que la mayoría de los suelos contienen miles de kilos de Potasio, sólo una pequeña cantidad está disponible para la planta durante el ciclo de crecimiento, menos de 2 %. Es vital mantener niveles adecuados de Potasio en el suelo porque este nutriente tiende a mantenerse en el sitio donde se coloca cuando se fertiliza. Al agregarse al suelo y disolverse, la sal se disociará en sus componentes, de los cuales el Potasio y el Magnesio serán retenidos en los sitios de intercambio con la arcilla y la materia orgánica. En cambio los sulfatos serán absorbidos en la superficie disponible de las arcillas, o bien inmovilizados por los microorganismos del suelo, o eventualmente lixiviados a horizontes más profundos.



SULPOMAG es una excelente fuente de Potasio y Magnesio solubles, inmediatamente asimilables por la planta. Es un fertilizante de origen natural apto para la producción orgánica que puede aplicarse sólo o junto a otros fertilizantes, adecuado para uso directo o como ingrediente de mezclas físicas. En su composición se encuentra Potasio soluble ( $K_2O$ ) 22.0 %, Azufre (S) 18.0 %, Magnesio ( $MgO$ ) 22.0 %, Cloruro máxima (Cl) 2.5 % y Humedad máxima 0.5 %.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Material botánico:

Estuvo constituido por yemas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en fase de multiplicación *in vitro*, procedentes del Laboratorio de Biotecnología de la Asociación Chira, Piura.

##### 3.1.2 Medios de cultivo:

###### A. Formulación y preparación del medio de cultivo de uso convencional en banano.

Los medios de cultivo estuvieron constituidos por las sales inorgánicas de Murashige y Skoog (MS) tal como lo indica en el cuadro 1. El contenido de cada medio de cultivo fue diluido en agua destilada y se le adicionó los compuestos orgánicos: tiamina HCl 0.4 mg/L, m-inositol 100 mg/L, reguladores de crecimiento y sacarosa, según como corresponda. El medio de cultivo de inducción de múltiples brotes y de enraizamiento se resume en el cuadro 2.

El pH fue ajustado entre 5.7 – 5.8, se le adicionó agar 0.6%, posteriormente fueron envasados en frascos de vidrio tipo compota y fueron esterilizados en autoclave por 20 min a 121 °C de temperatura y 15 lb/pulg<sup>2</sup> de presión, tanto el medio de cultivo de brotamiento como el medio de cultivo de enraizamiento de banano.

Cuadro 1. Composición química del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962).

N°	Constituyentes químicos	Concentración (mg/L)	Volumen de la Solución Madre/litro Medio Basal
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20
	KNO <sub>3</sub>	1900	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	
2	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2	1.0
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	22.3	
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025	
3	KI	0.83	1.0
4	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440.0	3.0
5	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3	5.0
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8	
6	Tiamina-HCl	0.4	1
7	m-inositol	100	12.5

Cuadro 2. Composición del medio de cultivo, utilizado en la propagación clonal *in vitro* de banano (*Musa sp.* var. **Cavendish**).

Constituyentes	Medio de cultivo de Inducción de Múltiples Brotes	Medio de cultivo de Enraizamiento
Medio MS	1	1/2
BAP (mg/L)	5.0	
AIA (mg/L)	0.2	
AIB (mg/L)		0.2
Carbón Activado %		0.25
Sacarosa %	4.0	3.0
Agar %	0.6	0.6

pH = 5.7 – 5.8

## **B. Formulación y preparación del medio de cultivo en experimentación**

Los medios de cultivo de experimentación fueron formulados como se indica en el cuadro 3, de acuerdo a los siguientes criterios:

1. La formulación del medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) fue modificado. Las sales correspondientes a los macronutrientes (MS macro) fueron sustituidas por Sulpomag específicamente las sales  $MgSO_4$  y al  $KH_2PO_4$ . Las sales correspondientes a los micronutrientes (MS micro), permanecieron a la misma concentración de la formulación de Murashige y Skoog (MS), así como lo referente a tiamina.HCl 0.4 mg/L, m-inositol 100 mg/L, agar 0.6%, sacarosa y los reguladores de crecimiento de acuerdo al medio de cultivo de brotamiento y enraizamiento convencional para banano como se indica en el Cuadro 2.

2. Para la sustitución de los Macronutrientes por el fertilizante inorgánico Sulpomag, se hallaron los pesos equivalentes de las unidades de magnesio, azufre y potasio presentes en las sales MS macro, tomando como base las concentraciones de estas sales para el fertilizante experimentado (Anexo 1). La formulación de los tratamientos estuvo entonces dada por la concentración de Sulpomag igual a 0.1096 g/L, siendo la cuarta parte del peso equivalente calculado con respecto a S, para que de esta manera no incurrir en deficiencia de Mg o en exceso de K en el medio de cultivo, de esta manera no tenga un comportamiento tóxico para el explante. Además, la concentración del  $KH_2PO_4$  fue la misma de las sales MS, el  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  en 150 mg/L, fue menor a la concentración de las sales MS, teniendo como referencia la concentración de las sales B5 y la concentración de  $KNO_3 + NH_4NO_3$  fue 1/5 y 1/10 de la concentración presente en las sales inorgánicas MS ya que no se puede sustituir totalmente por las fuentes nitrogenadas orgánicas utilizadas en este caso. (Cuadro 3).

Para la preparación del medio de cultivo el contenido de cada tratamiento fue diluido en agua destilada y se adicionó los compuestos orgánicos: tiamina.HCl 0.4 mg/L, m-inositol 100mg/L, sacarosa y reguladores de crecimiento según como corresponda a cada medio de cultivo (Cuadro 2). El pH de todos los tratamientos se ajustó a 5.7 – 5.8, y por último se le adicionó agar 0.6%, se envasó y esterilizó en las mismas condiciones que en el caso del medio de cultivo control.

Cuadro 3. Tratamientos ensayados en el estudio del efecto de fertilizante orgánico Sulpomag y las fuentes nitrogenadas orgánicas (CH y AC) en el cultivo de tejidos *in vitro* de banano (*Musa sp.* var. **Cavendish**)

Tratamientos*	Concentración MS <sup>1</sup> , B5 <sup>1</sup> y Sulp.	Concentración KNO <sub>3</sub> +NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	CH (mg/L)	AC (%)
<b>T1</b>	1	1/5	---	---
<b>T2</b>	1	1/5	250	---
<b>T3</b>	1	1/5	500	---
<b>T4</b>	1	1/5	---	10
<b>T5</b>	1	1/5	---	20
<b>T6</b>	1	1/10	---	---
<b>T7</b>	1	1/10	250	---
<b>T8</b>	1	1/10	500	---
<b>T9</b>	1	1/10	---	10
<b>T10</b>	1	1/10	---	20

\* = MS micronutrientes es igual para todo los tratamientos

MS<sup>1</sup> = 170 mg/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

B5<sup>1</sup> = 150 mg/L CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O

Sulp. = 0.1096 g/L Sulpomag

CH = Caseína Hidrolizada (Caseína de hidrólisis ácida)

AC = Agua de coco

## **3.2. Metodología**

La metodología seguida para la obtención de plantas de banano *in vitro* fue la propuesta por Vuylsteke y De Langhe. (1985, 1988) y Hardy y García (1994).

### **3.2.1. Procedimiento seguido en el cultivo *in vitro***

#### **A. Inducción de múltiples brotes**

##### **a. Obtención y selección del material vegetal**

El material vegetal para la inducción de múltiples brotes estuvo constituido por ápices de banano (*Musa sp* var. Cavendish) *in vitro* establecidos en medio de cultivo de inducción de múltiples brotes.

##### **b. Preparación del material de disección y cámara de flujo laminar**

El material de disección estuvo constituido por pinzas rectas y escalpelos con hojas de bisturí N° 24. Este material fue esterilizado a la llama del mechero de alcohol.

La cámara de flujo laminar de aire esterilizado, cuyo principio estriba en un sistema de filtros que sirven para esterilizar el aire del ambiente impelido por un ventilador accionado a motor, fue desinfectada previamente con alcohol etílico 70% tanto las paredes laterales, como la mesa de vidrio de la cámara donde se realizaron los trabajos *in vitro*

##### **c. Aislamiento y cultivo de explantes**

Una vez desinfectadas manos y brazos del operador con alcohol etílico 70% se procedió al aislamiento y cultivo *in vitro* de los explantes. La asepsia del material vegetal, por provenir de un cultivo *in vitro*, se considera *per se*.

Las plantas de banano *in vitro* fueron transferidas a los medios de cultivo de brotamiento. Sobre la mesa de la cámara de flujo laminar se colocó una placa de Petri esterilizada, sobre ella y con ayuda de pinzas y escalpelos se extrajo una planta bien constituida, se eliminaron las hojas y estos ápices fueron seccionados longitudinalmente por la mitad para romper la dominancia apical (Colmenares y Giménez, 2003), además de eliminar parte del tejido basal fenolizado. Una vez aislados, los ápices se cultivaron en el centro del frasco de vidrio conteniendo el medio de cultivo de brotamiento. El borde del frasco se flameó a la llama del mechero antes y después de la siembra, luego se cubrió con papel aluminio y por último se selló con plástico adhesivo.

Se observó la evolución de los explantes para determinar si necesitaban subcultivarse en medio de cultivo fresco y evitar, de esta manera, el efecto tóxico de la fenolización en los tejidos.

#### **d. Condiciones de incubación**

Los cultivos fueron acondicionados en el cuarto de incubación bajo las siguientes condiciones físicas de crecimiento:

Temperatura	:	22 ° C
Iluminación	:	5 – 10 W.m <sup>-2</sup>
Calidad de luz	:	Luz de día (fluorescentes de 30 W)
Fotoperiodo	:	16/8 horas día/noche

### **B. Enraizamiento de brotes**

#### **a. Obtención y selección del material vegetal**

Transcurrida 60 días de iniciado el cultivo de inducción de múltiples brotes, fueron seleccionados aquellos que alcanzaron una buena constitución morfológica y un tamaño aproximado de 2 cm.

#### **b. Aislamiento y cultivo de explantes**

Utilizando pinzas y escalpelos, en las mismas condiciones de asepsia observadas en los casos anteriores, fueron separados individualmente los brotes de un tamaño de 2 cm provenientes de los cultivos de múltiples brotes y cultivados en el medio de cultivo de enraizamiento. Los brotes pequeños adheridos al tejido maternal fueron subcultivados en el mismo medio de cultivo de procedencia hasta que alcanzaran el tamaño requerido para la transferencia a condiciones de enraizamiento.

#### **c. Condiciones de incubación**

Las condiciones de incubación fueron las mismas otorgadas para el cultivo de inducción de múltiples brotes.

### **C. Transferencia a suelo**

#### **a. Preparación del sustrato**

El material utilizado como sustrato en la transferencia de plantas de banano *in vitro* a suelo, estuvo constituido por tierra de cultivo, tierra vegetal, compost y limo en

proporciones iguales; estos componentes fueron mezclados de una manera uniforme y este sustrato fue esterilizado con calor seco.

La esterilización del sustrato se realizó en horno a temperatura de 50°C durante una hora; posteriormente este sustrato fue distribuido en pequeños maceteros y humedecidos con agua destilada.

#### **b. Transferencia a suelo**

Las plántulas fueron extraídas de los tubos de ensayo con ayuda de una pinza recta desinfectada con alcohol etílico 70%, los restos del agar adherido a las raíces fueron eliminados mediante un lavado con agua corriente.

Una vez sembradas las plántulas fueron cubiertas con bolsas de polietileno transparentes humedecidas en su interior con agua destilada, con la finalidad de crearles un ambiente de alta humedad. Antes de su traslado a invernadero los riegos se realizaron con agua destilada en los primeros días y posteriormente con agua corriente y de manera periódica. Al cabo de diez días fueron trasladados a invernadero para su ambientación completa y luego transferidas a bolsas de polietileno conteniendo como sustrato tierra de cultivo y arena de río, antes de ser instaladas en campo definitivo.

### **3.2.2. Procedimiento seguido en la evaluación y análisis estadístico**

#### **a. Procedimiento seguido en la evaluación del material *in vitro***

En la propagación clonal de banano, mediante el cultivo de ápices, la evaluación se realizó de la siguiente manera:

- Para el caso del brotamiento múltiple; las variables evaluadas fueron el número de brotes, altura de los brotes en este caso se utilizó una regla graduada en centímetros con aproximación milimétrica, el número de plantas normales (plantas sin síntomas visuales de deficiencia nutricional; clorosis o necrosis) estos datos se registraron a 30 y 60 días de instalado el tratamiento.
- Para el caso del enraizamiento; las variables a evaluar fueron número de raíces, tamaño de raíces, altura final, tasa de crecimiento para estos casos se utilizó una regla graduada en centímetros con aproximación milimétrica y el peso fresco en



gramos se midió en una balanza eléctrica, estos datos se registraron a 30 días de instalado el tratamiento.

- En la transferencia a suelo se midió la sobrevivencia de las plantas después de 30 días, y se representó en forma porcentual.

**b. Procedimiento seguido en el análisis estadístico.**

El sistema se comparó con la técnica convencional en medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado con hormonas y vitaminas ya mencionadas.

Para evaluar las diferencias entre los tratamientos se aplicó la prueba paramétrica “post hoc” de múltiples rangos de Duncan para ANOVA de un factor para determinar grupos homogéneos a un nivel de significación del 5,0% ( $p \geq 0,05$ ), estos parámetros fueron obtenidos con el software estadístico SPSS Statistics 19.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Multiplicación de brotes

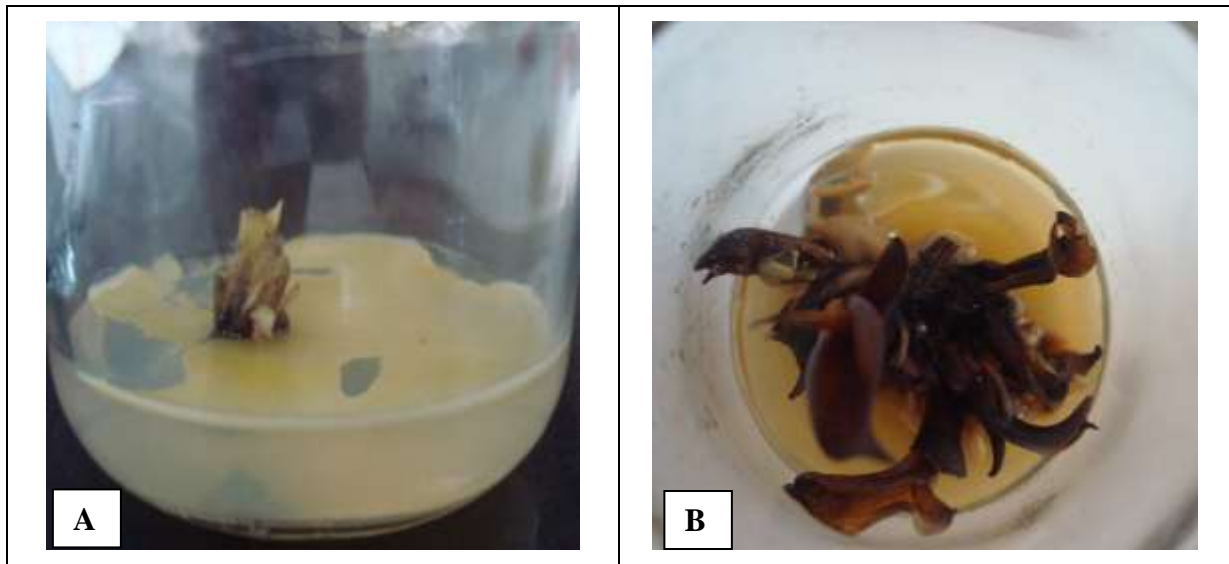
En el establecimiento de la fase de multiplicación en los diferentes tratamientos se observó la presencia de contaminación bacteriana; la misma que presentó un aspecto de exudado de color crema lechoso ligeramente mucoso (Figura 1. a, b), los mismos eran bacilos Gram positivos con endosporas; el resultado preliminar del análisis microbiológico reveló la presencia de bacterias del género *Bacillus* (Anexo 21).

Una de las principales causas de pérdida de material vegetal se debió precisamente a la contaminación bacteriana; sin embargo, como se sabe este es un problema en los cultivos *in vitro* de banano, como lo menciona Carranza, et al (2006) en cuyos trabajos detectó la bacteria *Bacillus subtilis*, esta bacteria llegaba a cubrir totalmente la superficie del explante, provocando clorosis, necrosis del tejido y finalmente la muerte de las plantas *in vitro* de banano (cv. FHIA-18) y esta contaminación provenía de la superficie interna de los frascos listos para la dispensación del medio de cultivo (Anexo 20). Por otro lado, Mirabal (2005) determinó que la fuente de entrada del microorganismo *Bacillus sp.* fue el agua empleada en la preparación del medio de cultivo; sin embargo, Leifert y Waites (1993) sugieren que miembros de este género son tradicionalmente contaminantes introducidos como resultado de prácticas de laboratorio deficientes.

Asimismo, el material vegetal tomado como material de iniciación también puede portar este microorganismo endógeno ya que hay autores que refieren al explantes de diversas especies de plantas como la vía de entrada de *Baccillus spp.* (Leifert y Waites, 1993; Van de houwe, 1998; Moutia y Dookun 1999; Thomas, 2004). Esto se debe a que no se puede descartar la posibilidad que se encuentren en los espacios intercelulares y así escapan de la desinfección y manifiestan crecimiento en el medio de cultivo en condiciones de estrés para el material vegetal como lo menciona Portal et al. (2003), en resultados que implicaron al explante inicial como la principal fuente de contaminación microbiana en el establecimiento del guayabo.

La contaminación se logró controlar con la aplicación conjunta de Cloranfenicol y Rifampicina en concentración de 10g/L y 6g/L, respectivamente en agua destilada esterilizada la cual se colocó aproximadamente 10 ml en frascos esterilizados en los cuales se

colocaron los explantes contaminados por un periodo de 48 horas; posterior al tratamiento antimicrobiano los explantes se incubaron en medio de cultivo de brotamiento múltiple convencional para banano y de esta forma se pudo obtener buenos resultados y recuperar el material contaminado por *Bacillus spp.*



**Figura 1. A.** Contaminación bacteriana (*Bacillus spp*) presente en la etapa de multiplicación de banano (*Musa sp.* var. Cavendish, AAA). **B.** Oscurecimiento del medio de cultivo y necrosis total de las plantas *in vitro* por la acción de *Bacillus spp.*

#### a. Número de brotes:

El número de brotes generados en la yemas sometidas a los diferentes tratamientos en experimentación fueron evaluados a 30 y 60 días, luego de ser establecido el cultivo *in vitro*.

En el cuadro 4 se expresa el número de brotes promedio de *Musa sp.* var. Cavendish, evaluadas luego de 30 días de instalado el cultivo de yemas en los diferentes tratamientos para inducción de brotamiento, observándose que el tratamiento control (T0) alcanzó el valor promedio de 4.2 brotes, observándose promedios muy similares a los tratamientos T3 y T4 que alcanzaron 3.5 y 4.0 brotes. Los tratamientos que alcanzaron el menor promedio en el número de brotes fueron el tratamiento T6 y T7 que alcanzaron 1.9 y 1.7 brotes, respectivamente.

Realizado el análisis de varianza, éste mostró significancia estadística para los tratamientos con un coeficiente de variabilidad de 37.18% (Anexo 2)

La prueba de Duncan, efectuada para la característica número de brotes a 30 días, con respecto a los tratamientos en estudio mostró el mayor valor para el tratamiento control (T0) con 4.2 brotes, seguidos del tratamiento T4 y T3; resultando estadísticamente iguales; de igual modo, el grado de significancia fue el mismo. Estos tratamientos fueron de significancia estadísticamente superior a los tratamientos T6 y T7 que alcanzaron un promedio de 1.9 y 1.7 brotes, respectivamente (Anexo 3).

En la evaluación realizada a 60 días luego del cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos (Cuadro 4), el número de brotes fue incrementándose (Figura 2), observándose en el tratamiento control T0 un promedio de 5.1 brotes, muy similar a los promedios de los tratamientos T3 que alcanzó 4.8 brotes y el tratamiento T5 que alcanzó 5.4 brotes. Los tratamientos que alcanzaron el menor promedio en el número de brotes fueron el tratamiento T7 y T8 que alcanzaron 2.5 y 3.1 brotes en el momento de la evaluación (Figura 3).

**Cuadro 4.** Medias del número de brotes de *Musa sp. var. Cavendish* cultivadas en el medio de cultivo de inducción de múltiples brotes *in vitro*, a 30 y 60 días de incubación.

TRATAMIENTOS*	FASE DE BROTAMIENTO	
	Número de brotes	
	30 DÍAS	60 DÍAS
T0	4.2 d	5.1 cd
T1	2.9 b	3.8 bc
T2	3.1 bc	3.8 bc
T3	3.5 bcd	4.8 cd
T4	4.0 cd	4.7 cd
T5	2.9 b	5.4 d
T6	1.9 a	3.3 ab
T7	1.7 a	2.5 a
T8	2.6 ab	3.1 ab
T9	3.2 bc	4.1 bc
T10	3.0 bc	4.3 bcd

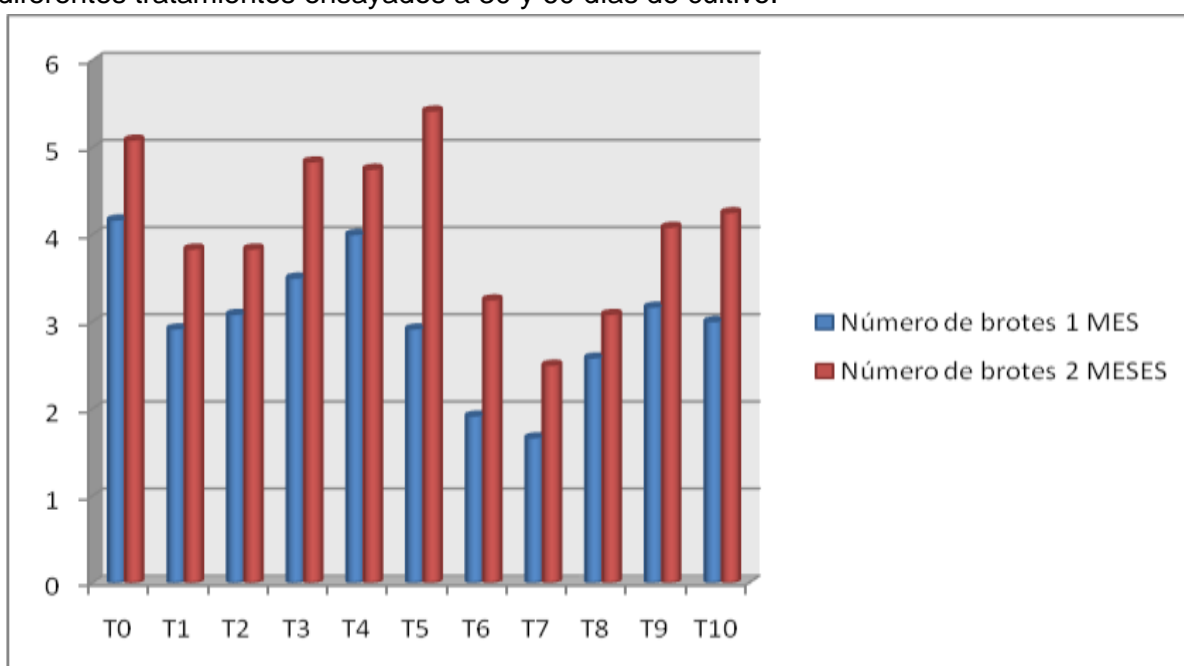
\*12 repeticiones por cada tratamiento

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas según prueba de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

El análisis de varianza para el número de brotes a 60 días, mostró significancia estadística para los tratamientos, y el coeficiente de variabilidad fue 33.68% (Anexo 4).

La prueba de Duncan, efectuada para la característica número de brotes a 60 días con respecto a los tratamientos en estudio, mostró el mayor valor para el tratamiento T5 con 5.4 brotes, seguido del tratamiento control (T0) y el tratamiento T3, resultando estadísticamente iguales con el mismo grado de significancia y superiores a los tratamientos T7 y T8 que alcanzaron un promedio de 2.5 y 3.1 brotes, respectivamente (Anexo 5).

**Figura 2.** Comparación del número de brotes de *Musa sp.* var. Cavendish entre los diferentes tratamientos ensayados a 30 y 60 días de cultivo.

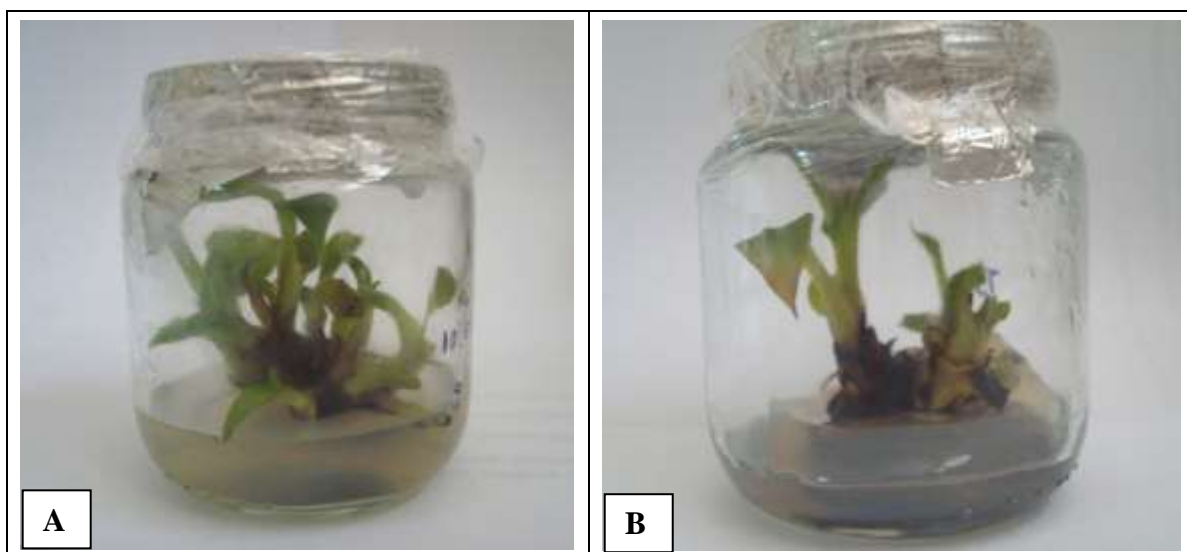


Los mejores resultados obtenidos en el número de brotes o índice de multiplicación clonal (IM) son muy similares a los obtenidos por Colmenares y Giménez (2000) para plátano Hartón (*Musa*, AAB), alcanzando valores promedios de 4,3 brotes en medio de cultivo suplementado con 5 mg/L de BA. La misma concentración de BA para la inducción de brotes de bananos en el subgrupo Cavendish, en medio de cultivo sólido, produjo un índice de multiplicación de 4,9 brotes (Hardy y García, 1994); sin embargo, difieren con los resultados obtenidos por Colmenares y Giménez (2003) para banano cv. Williams (*Musa*, AAA), donde en las mismas condiciones de cultivo se obtuvo un índice de multiplicación de 2,4 brotes. En plátano variedad Maqueño (*Musa balbisiana* AAB) se obtuvo una mayor diferenciación de brotes en 5 mg/L de BAP + 1.2 mg/L AIA, llegando a 2.5 brotes

(Canchignia et al. 2007); para bananos cv. Grand Nain (AAA) del subgrupo Cavendish propagados en 2,5 mg/L de BA, ha sido reportado un índice de multiplicación de 2,1 brotes (Alvard y Teisson. 1993) y, además, Cancchignia y Ramos (2004) alcanzaron la mayor tasa de multiplicación con un promedio de 5,3 brotes por explante para plátano variedad Barragante, en un tratamiento suplementado con 2,5 mg/L de BAP + 0,8 mg/L AIA.

De esta manera puede observarse que la variabilidad o componente genético existente entre los individuos de una misma especie estarían condicionando las respuestas frente a un medio de cultivo con en el mismo balance hormonal. Opinión que concuerda con Cancchignia et al. (2007), quien expresa que en una población no existen individuos que tengan la misma información genética (ADN), lo que influye en la variedad de respuestas frente a las concentraciones hormonales en la proliferación de brotes en este caso.

Por otro lado, con respecto a los aditivos orgánicos que se le puede adicionar a los medios de cultivo, tenemos que Colmenares y Giménez (2003) observaron que en la multiplicación de banano cv. Williams (AAA) en medio de cultivo con 1,5 mg/L de BA suplementado con 20% de agua de coco (IM=2.4), lograron índices de multiplicación similares a los obtenidos en medio de cultivo con la concentración de BA 2,5 mg/L (IM=2.75), sugiriendo que el agua de coco podría sustituir a la hormona 6-Benziladenina (BA) en la fase de inducción de brotes. Como es ampliamente conocido, el agua de coco es una sustancia de extrema complejidad que posee una amplia variedad de componentes orgánicos e inorgánicos; entre los compuestos orgánicos tenemos un gran número de aminoácidos esenciales (nitrógeno no proteínico soluble), diversos compuestos nitrogenados, hormonas, enzimas, purinas y pirimidinas. También se encuentran sales minerales y alto contenido de fósforo y magnesio (Anexo 22), por ello es que se ha incluido como complemento de medios de cultivo en numerosos trabajos de investigación en morfogénesis, principalmente. Además, Amornwat y Kanchanapoom (2007) en el cultivo de *Musa* del grupo AA comparó un medio de cultivo convencional de banano con un medio que presentaba Caseína Hidrolizada (100 mg/L) observando que en el medio de cultivo convencional el número de brotes disminuía notablemente.



**Figura 3.** Brotación múltiple observados en explantes de *Musa sp.* var. Cavendish en fase de multiplicación. **A.** Tratamiento control (T0) después de 60 días de incubación, **B.** Tratamiento T5, después de 60 días de incubación.

#### **b. Longitud de brotes**

En cuanto a la longitud de brotes, ésta característica fue evaluada en dos etapas; una a 30 días de establecido el cultivo *in vitro* y otra a 60 días.

En el cuadro 5 se expresa la longitud promedio de brotes de *Musa sp.* var. Cavendish, evaluadas a 30 días luego de instalado el cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos, observándose que en el tratamiento T7 se alcanzó una mayor elongación en promedio con 1.45 cm; este promedio fue muy similar al tratamientos T8 que alcanzó 1.43 cm y el tratamiento T5 que alcanzó 1.42 cm. Estos tratamientos fueron estadísticamente superiores al tratamiento control (T0) que obtuvo un promedio de 1.21 cm de longitud. Los tratamientos que alcanzaron el menor promedio en la longitud de brotes fueron el tratamiento T10 y T9 con 0.89 y 0.90 cm, respectivamente.

El análisis de varianza para la longitud de brotes, a 30 días de cultivo, mostró significancia estadística para los tratamientos; el coeficiente de variabilidad fue 20.15%.(Anexo 6)

La prueba de Duncan, efectuada para la característica altura de brotes a 30 días con respecto a los tratamientos en estudio, mostró que el mayor valor lo obtuvo el tratamiento T7 con 1.45 cm, seguido del tratamiento T8 y T5, resultando estadísticamente iguales con el mismo grado de significancia; así mismo, estos tratamientos fueron de significancia

estadísticamente superior a los tratamientos T10 y T9 que alcanzaron un promedio de 0.89 y 0.90 cm, respectivamente (Anexo 7).

En la segunda evaluación, la longitud promedio de brotes de *Musa sp.* var. Cavendish, al cabo de 60 días luego del cultivo en los respectivos tratamientos, se observó que el tratamiento control (T0) alcanzó el mayor valor promedio con 1.81 cm; este promedio fue muy similar a los tratamientos T5 y T8 que alcanzaron 1.58 y 1.46 cm, respectivamente. Los tratamientos que alcanzaron el menor promedio en la longitud de brotes fueron el tratamiento T7 y T6 llegando a 1.14 y 0.95 cm, respectivamente (Cuadro 5).

El análisis de varianza para la altura de brotes a 60 días, mostró significancia estadística para los tratamientos; el coeficiente de variabilidad fue 23.66% (Anexo 8).

La prueba de Duncan, efectuada para la característica altura de brotes a 60 días con respecto a los tratamientos en estudio, mostró que el mayor valor lo obtuvo el tratamiento control (T0) con 1.81 cm, seguido del tratamiento T5 con 1.58 cm, resultando estadísticamente iguales con el mismo grado de significancia. Estos tratamientos fueron de significancia estadísticamente superior a los tratamientos T6 y T7 (Anexo 9).

La variable longitud de planta, difiere a lo observado por Canchignia et al. (2007) en plátanos de la variedad Maqueño (*Musa balbisiana* AAB) donde una mayor longitud de brotes fue obtenido en el tratamiento que contenía 5 mg/L de BAP + 1.2 mg/L de AIA, mostrando una longitud promedio de 3.28 cm y para Canchignia y Ramos (2004), trabajando con plátano variedad Barragante, en el tratamiento que incluía 2 mg/L de BAP obtuvo brotes con un promedio de 2,75 cm de longitud. Un caso que difiere significativamente es el realizado por Ganapathi et al. (1995) en banano del cv. Basrai (AAA) el cual obtuvo brotes que llegaron a medir 7 cm de longitud.

Esta baja respuesta de los tratamiento T6 y T7, tanto en el número de brotes como en su altura (Figura 4) motivó a que se discontinuarán para la fase de enraizamiento. Una posible explicación a esta disminución del número y altura de brotes, puede deberse a que en estos tratamientos se incluían bajos niveles de nitrógeno, ya que el tratamiento T6 solo presentaba 1/10 de  $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$  y el tratamiento T7 presentaba 1/10 de  $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$  además de 250 mg de CH, por lo observado estos compuestos nitrogenados no fueron suficientes para obtener buenos resultados fisiológicos de los brotes, en comparación a los demás tratamientos en experimentación, resultando el



nitrógeno un elemento nutritivo primario limitante del crecimiento y desarrollo de los brotes, como lo menciona Kirby et al. (1987) el cual lo reportó en una recopilación de estudios referentes a la nutrición con nitrógeno ya sea como nitrato, amonio o urea.

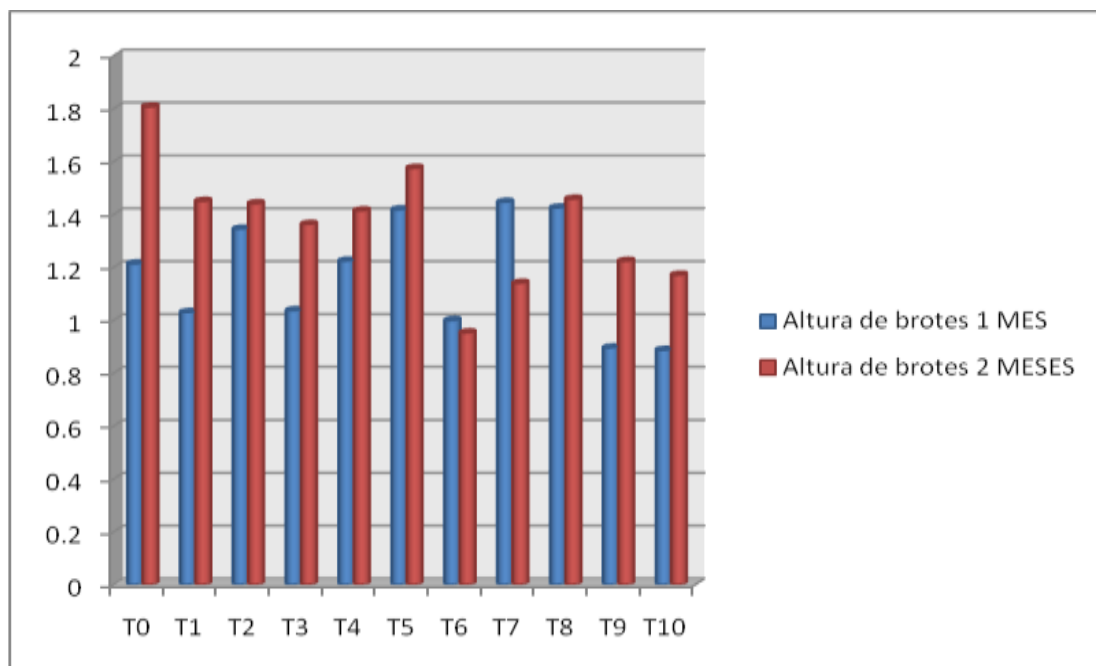
**Cuadro 5.** Medias de la altura de brotes de *Musa sp.* var. Cavendish cultivadas en el medio de cultivo de inducción de múltiples brotes *in vitro*, a 30 y 60 días de incubación.

TRATAMIENTOS*	FASE DE BROTAMIENTO	
	Altura de brotes (cm)	
	30 DÍAS	60 DÍAS
T0	1.21 bc	1.81 e
T1	1.03 ab	1.45 cd
T2	1.35 cd	1.44 cd
T3	1.04 ab	1.36 bcd
T4	1.22 bc	1.41 bcd
T5	1.42 cd	1.58 de
T6	0.99 a	0.95 a
T7	1.45 d	1.14 ab
T8	1.43 cd	1.46 cd
T9	0.90 a	1.22 abc
T10	0.89 a	1.17 abc

\*12 repeticiones por cada tratamiento

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas según prueba de Duncan ( $p \leq 0,05$ )

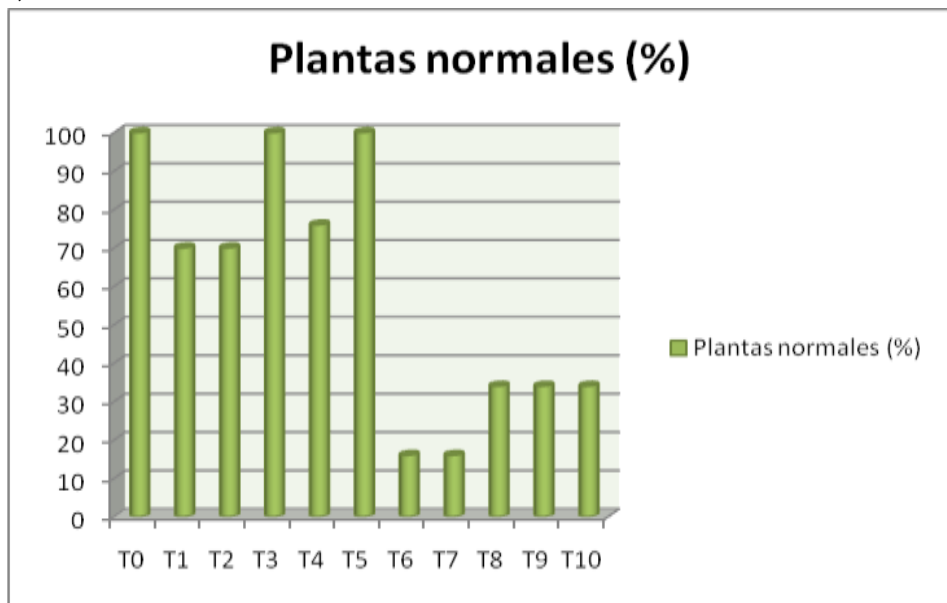
**Figura 4.** Comparación de la altura de brotes de *Musa sp.* var. Cavendish entre los diferentes tratamientos ensayados a 30 y 60 días de cultivo.



**c. Brotes normales (Aspectos morfológicos de los brotes)**

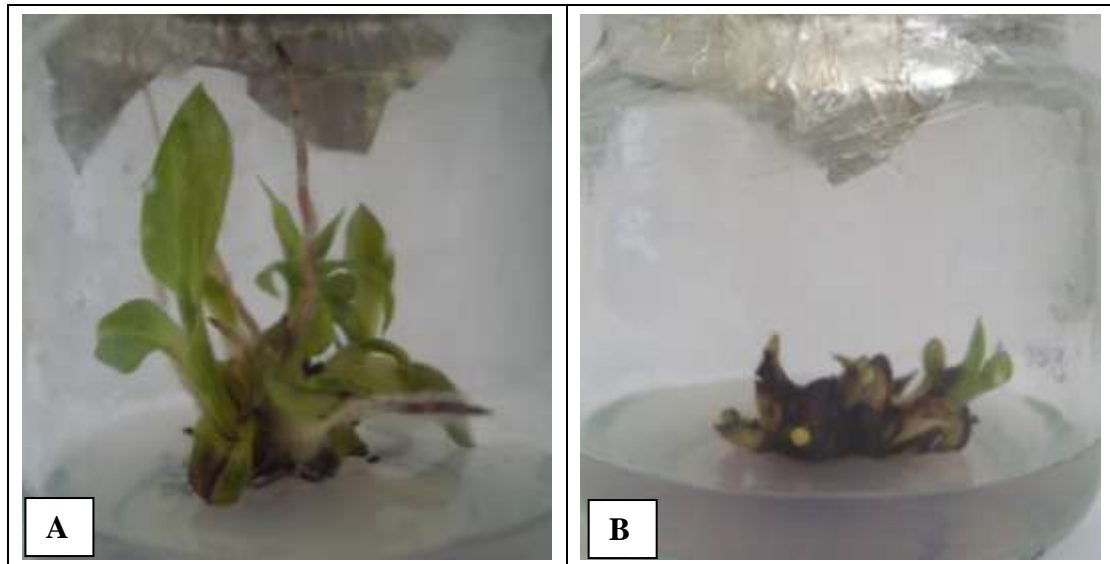
Esta característica se midió solo 60 días de cultivo. Los tratamientos T0, T3, T4 y T5, presentaron la mayor cantidad de brotes sin síntomas aparentes de deficiencias nutricionales, clorosis o necrosis (Figura 5). En el tratamiento control (T0) y en los tratamientos T3 y T5 se obtuvo 100% de plantas normales, en la fase de multiplicación de brotes. Los tratamientos con un mayor número de brotes con síntomas nutricionales fueron los tratamientos T6 y T7 obteniendo solo 16% de plantas sanas; estos tratamientos mostraron, también, raquitismo y escaso crecimiento; debido a ello los brotes que crecieron en estos tratamientos fueron descartados y no se continuó con la evaluación de los mismos. En la Figura 5, podemos observar que en los tratamientos que presentaron menor concentración de nutrientes presentaron, también, menor número de plantas normales (Figura 6). El desarrollo de clorosis en plantas *in vitro* puede ser resultado de desbalances en minerales en el medio de cultivo, como en el caso de híbridos de *Eucalyptus*, donde particularmente altos niveles de K y de P, pueden causar una deficiencia fisiológica de Fe (Gribble et al. 2002).

**Figura 5.** Brotes de *Musa sp.* var. Cavendish normales en los diferentes tratamientos ensayados, a 60 días de incubación.



Es importante resaltar, que aunque se trató de ajustar de la mejor manera el tipo y concentración de los productos empleados en la preparación de los medios de cultivo, con la composición del medio MS, siempre existirán impurezas o trazas de otros elementos

(cloruros y sodio) que no se consideran en el cálculo, o por efecto de la formulación del producto comercial son imposibles de obviar o eliminar. Estas impurezas o trazas de elementos pueden influir en la nutrición, metabolismo o fisiología de explantes (Azofeifa et al., 2008).



**Figura 6.** Comparación de plantas sanas observados en brotes de *Musa sp.* var. Cavendish en fase de brotamiento múltiple después de 60 días de cultivo. **A.** Tratamiento control (T0), **B.** Tratamiento T6

A manera de discusión general para la fase de brotamiento múltiple, los medios de cultivo MS (T0), el tratamiento T3 (1/5 de  $\text{NH}_4\text{NO}_3+\text{KNO}_3$  y 500 mg/L de CH) y el tratamiento T5 (1/5 de  $\text{NH}_4\text{NO}_3+\text{KNO}_3$  y 20% de AC) presentaron un comportamiento muy similar entre ellos para las diferentes variables en la fase de brotación múltiple; esto quizás se deba a la complejidad de nutrientes presentes en la caseína hidrolizada (CH) y el agua de coco (AC) (Anexos 22 y Anexo 23), además, de proporcionar una rica fuente de nitrógeno no reducido el cual fue complementado por el nitrógeno inorgánico. Pollock y Oppenheimer (1999), tampoco observaron diferencias en el crecimiento de plantas de *Arabidopsis*, al cultivarlas en un medio de cultivo suplementado con el fertilizante comercial 20-10-20, comparado con lo obtenido en el medio de cultivo MS. Así como también Azofeifa et al. (2008) utilizó abonos foliares como el AMSF y AMSF+Intra, para la propagación in vitro de plantas de papa cv. Atzimba, obteniendo buenos resultados.

## 4.2. Enraizamiento

### a. Altura de plantas enraizadas

En el cuadro 6 se expresa la altura promedio de plantas de *Musa sp.* var. Cavendish, evaluadas a 30 días de cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos ensayados para enraizamiento (Figura 8), observándose que el tratamiento T5 alcanzó una mayor elongación promedio con 5.5 cm, muy similar al tratamiento control T0 que alcanzó 5.3 cm seguido del tratamiento T4 con 4.8 cm (Figura 7). Los tratamientos que alcanzaron el menor promedio en la altura de brotes fueron el tratamiento T9 y T10 con 3.3 y 3.4 cm, respectivamente.

El análisis de varianza para la altura final de la planta, mostró significancia estadística para los tratamientos; el coeficiente de variabilidad fue 16.33%. (Anexo 10)

La prueba de Duncan, efectuada para la característica altura final de planta, con respecto a los tratamientos en estudio, mostró que el mayor valor lo obtuvo el tratamiento T5 con 5.47 cm, seguido del tratamiento control T0 y el tratamiento T4, resultando por lo tanto estadísticamente iguales con el mismo grado de significancia, así mismo, estos tratamientos fueron estadísticamente superiores a T9 y T10 que alcanzaron un promedio de 3.3 y 3.4 cm respectivamente (Anexo 11).

Esto resultó similar a lo obtenido por Amornwat y Kanchanapoom (2007), en el cultivo de *Musa* del grupo AA donde obtuvo brotes con una longitud 4 a 5 cm y a Gübbük y Pekmezcü (2004) los cuales obtuvieron plantas de banano con una longitud variada entre 4.36 y 5.86 cm, pero difiriendo de Canchignia (2004) el cual obtuvo una longitud de 6.5 cm en plantas de plátano var. Barragante, en un tratamiento de enraizamiento *ex vitro* que presentaba un sustrato de carboncillo.

**Cuadro 6.** Medias de todas las variables evaluadas en el medio de cultivo de enraizamiento para *Musa sp.* var. Cavendish, a 30 días de incubación.

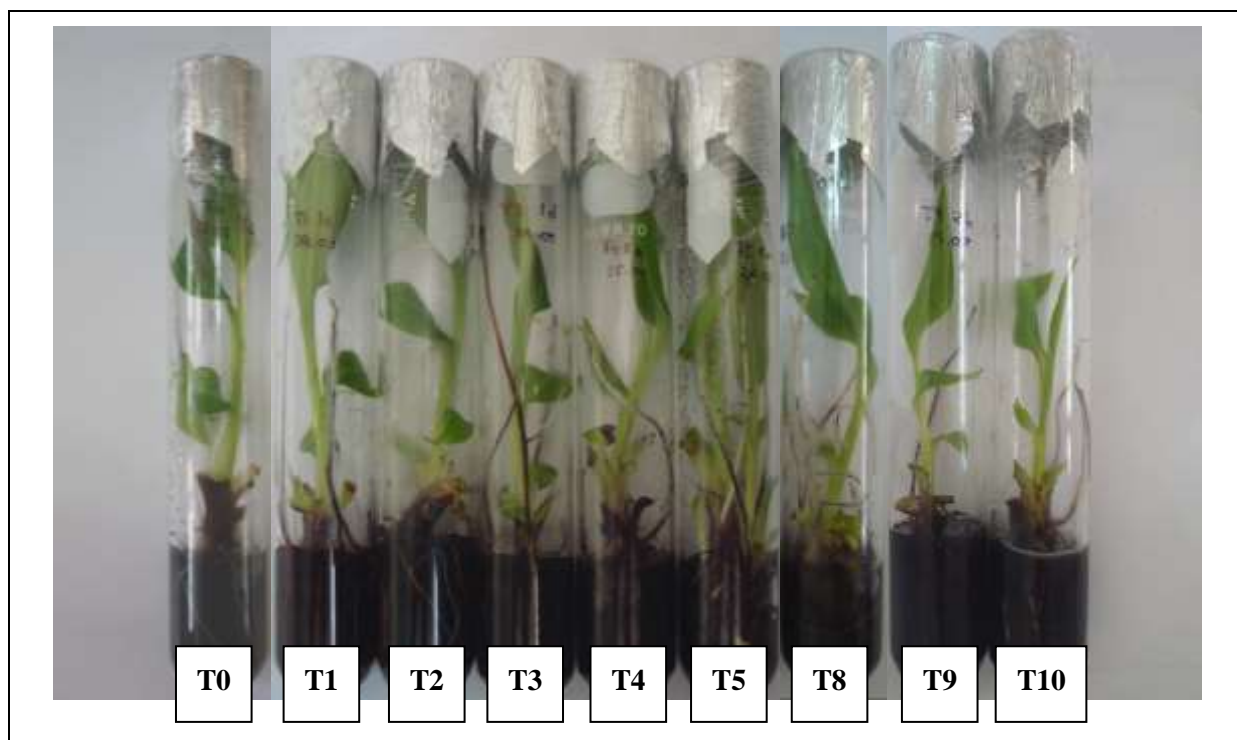
<b>FASE DE ENRAIZAMIENTO</b>					
<b>TRATAMIENTOS*</b>	<b>ALTURA DE LA PLANTA (cm)</b>	<b>TASA DE CRECIMIENTO (cm)</b>	<b>NÚMERO DE RAICES</b>	<b>TAMAÑO DE RAICES (cm)</b>	<b>PESO FRESCO (g)</b>
T0	5.3 de	2.39 ab	8.0 abcd	41.46 ab	2.29 d
T1	4.6 cd	2.83 bc	8.8 cde	53.39 b	1.91 cd
T2	4.4 bc	2.59 b	10.3 e	49.50 ab	2.03 cd
T3	4.7 cd	2.67 b	10.4 e	53.40 b	1.97 cd
T4	4.8 cde	2.83 bc	8.3 bcd	37.44 a	1.72 bc
T5	5.5 e	3.52 c	9.3 de	53.85 b	2.25 d
T8	3.8 ab	2.07 ab	7.3 abc	41.98 ab	1.44 ab
T9	3.3 a	1.76 a	6.6 a	36.39 a	1.12 a
T10	3.4 a	1.64 a	6.9 ab	38.67 a	1.17 a

\* 10 repeticiones

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas según prueba de Duncan ( $p \leq 0,05$ )



**Figura 7.** Altura de planta observada en *Musa sp.* var. Cavendish en fase de enraizamiento. Tratamiento T0, después de 30 días de incubación.



**Figura 8.** Crecimiento de plantas de banana *Musa sp.* var. Cavendish en medio de cultivo de enraizamiento *in vitro*, a 30 días de incubación.

#### **b. Tasa de crecimiento**

En el cuadro 6 se expresa tasa de crecimiento promedio de *Musa sp.* var. Cavendish, evaluada a 30 días después del cultivo *in vitro*, en los diferentes tratamientos ensayados. Se puede observar que en el tratamiento T5 se alcanzó una mayor tasa de crecimiento en promedio con 3.52 cm. Este valor fue muy similar al de los tratamientos T1 y T4 donde ambos alcanzaron 2.83 cm en crecimiento; de igual manera, estos tratamientos fueron estadísticamente superiores al tratamiento control T0 que obtuvo un promedio de 2.39 cm. Los tratamientos T9 y T10 fueron los que alcanzaron el menor promedio en la altura de brotes con 1.76 y 1.64 cm, respectivamente (Cuadro 6).

El análisis de varianza para la tasa de crecimiento, mostro significancia estadística para los tratamientos; el coeficiente de variabilidad fue 32.41% (Anexo 12).

La prueba de Duncan, efectuada para la característica tasa de crecimiento con respecto a los tratamientos en estudio mostró, que el mayor valor lo obtuvo el tratamiento T5 con 3.52 cm, seguido de los tratamientos T4 y T1; resultando estadísticamente iguales con el mismo grado de significancia; estos tratamientos fueron de significancia estadística

superior a los tratamientos T10 y T9 que alcanzaron un promedio de 1.64 y 1.76 cm, respectivamente (Anexo 13).

En el tratamiento sin compuestos orgánicos (tratamiento control), se observó una tasa de crecimiento menor en cuanto a la longitud de plántulas comparándolas con el tratamiento T4 y T5 que incluían 10% y 20% de agua de coco en su formulación; estos resultados se asemejan con los obtenidos por Rodríguez (2000), en *Paphiopedilum caudatum* donde se observaron las mayores tallas en las plántulas al agregar al medio de cultivo compuestos orgánicos como el agua de coco y 12% de pulpa de plátano; así mismo, Moreno y Menchaca (2007) utilizando 12% de agua de coco y 10% de pulpa de plátano en el medio de cultivo para *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidaceae) obtuvo los mejores resultados en longitud de plantas.

### **c. Número de raíces**

En el cuadro 6 se expresa el número de raíces promedio de *Musa sp.* var. Cavendish, evaluadas a 30 días del cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos ensayados, observándose que en el tratamiento T3 se alcanzó un mejor enraizamiento con 10.4 raíces en promedio, muy similar al tratamiento T2 donde se observaron 10.2 raíces, seguido del tratamiento T5 con 9.3 (Figura 9). Estos tratamientos fueron estadísticamente superiores al tratamiento control (T0) que obtuvo un promedio de 8.0 raíces. Los tratamientos que alcanzaron el menor promedio, en el número de raíces formadas, fueron el tratamiento T9 y T10 que alcanzaron 6.6 y 6.9 raíces en promedio, respectivamente.

El análisis de varianza para el número de raíces, mostró significancia estadística para los tratamientos; el coeficiente de variabilidad fue 19.89%. (Anexo 14)

La prueba de Duncan, efectuada para la característica número de raíces con respecto a los tratamientos en estudio, mostró que el mayor valor lo obtuvo el tratamiento T3 con 10.4 raíces, seguido de los tratamientos T2 y T5, resultando estadísticamente iguales con el mismo grado de significancia. Estos tratamientos fueron superiores a los tratamientos T9 y T10 que alcanzaron un promedio de 6.6 y 6.9 raíces, respectivamente (Anexo 15).

Estos resultados difieren significativamente por los obtenidos por Portero (1991) y Guerra et al. (2002) los cuales observaron que el número de raíces formadas varió entre 1 a 4, entre los medios de cultivo y genotipos de plátano y banano ensayados, pero similar a lo

que reportó GÜbbük Y Pekmezcü (2004) el cual obtuvo un número de 10 a 12 raíces por planta de banano.

En general, la inducción de raíces en brotes de los diferentes tratamientos estudiados no resultó mayor problema, puesto que en menos de dos semanas ya era posible obtener brotes óptimamente enraizados, caso contrario con lo observado por Sosa (1991) en nudos de camote en un medio de cultivo que presentaba como principal componente el fertilizante convencional Urea en el cual no obtuvo raíces siendo muchas veces tóxico para el explante; un resultado similar lo obtuvo Buro (2001), en una línea comercial perteneciente al clon Williams obteniendo 93.02% plántulas enraizadas, sin embargo, cabe resalta que fue difícil obtener en algunos tratamientos brotes enraizados simultáneamente a su diferenciación o en todo caso la elongación es muy lenta, tal como lo reportaron Versey y Rivera (1981), quienes lograron inducir raíces luego de 50 días de desarrollo de los brotes. Un resultado similar reportaron Berg y Bustamante (1974) quienes lograron enraizar meristemas luego de 2 a 3 meses de cultivo, sin lograr que el brote tuviera un desarrollo mayor de un centímetro, hecho que sólo se alcanzó después de 3 a 4 meses.

#### **d. Tamaño de raíces**

En el cuadro 6 se expresa también el tamaño promedio de las raíces de *Musa sp.* var. Cavendish, evaluadas a 30 días de cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos ensayados, observándose en el tratamiento T5 un mayor tamaño de raíces con un promedio de 53.85 cm. Este promedio fue muy similar a los tratamientos T1 y T3 que alcanzaron 53.39 y 53.40 cm (Figura 9). Estos tratamientos fueron estadísticamente superiores al tratamiento control T0 cuyas raíces alcanzaron un promedio de 41.46 cm de longitud. Los tratamientos que alcanzaron el menor promedio en el tamaño de las raíces fueron el tratamiento T4 y T9 que mostraron una longitud promedio de 37.44 y 36.39 cm, respectivamente.

El análisis de varianza para el tamaño de las raíces, mostro significancia estadística para los tratamientos; el coeficiente de variabilidad fue 29.28% (Anexo 16)

La prueba de Duncan, efectuada para la característica el tamaño de las raíces con respecto a los tratamientos en estudio, mostró que el mayor valor lo obtuvo el tratamiento T5 con 53.85 cm, seguidos de los tratamientos T3 y T1, resultando estadísticamente iguales con el mismo grado de significancia. Estos tratamientos fueron estadísticamente superiores a los



tratamientos T9 y T4 que alcanzaron un promedio de 36.39 y 37.44 cm, respectivamente (Anexo 17).

Los tratamientos que presentaban la concentración más alta de nitrógeno, tanto en su forma orgánica (500 mg/l CH y 20% AC) como inorgánica (1/5 de  $\text{NH}_4\text{NO}_3+\text{KNO}_3$ ), presentaron un mayor tamaño en las raíces de las plántulas de banano superando ampliamente al tratamiento control, pero también tenemos que resaltar al tratamiento T1 que presenta solo 1/5 de  $\text{NH}_4\text{NO}_3+\text{KNO}_3$  en su composición, el cual obtuvo un promedio similar a los mejores resultados; esto quizás se deba a la necesidad de la planta por obtener nutrientes en un medio muy pobre o por otra parte el nitrógeno en su forma asimilable ( $\text{NO}_3^-$ ) no es tanto indispensable para la formación y tamaño de raíces en el cultivo de banano *in vitro*. Esto fue también observado por Romero et al. (2007) quien utilizó complejos de fertilizantes comerciales como sustitutos de los componentes del medio de cultivo MS en la propagación *in vitro* de *Laelia anceps*, obteniendo los mejores resultados en número y tamaño de raíces con los fertilizantes Peters (24-8-16) y Floren (10-15-5), siendo superiores al tratamiento control (MS).



**Figura 9.** Número y tamaño de raíces observadas en *Musa sp.* var. Cavendish en fase de enraizamiento. Tratamiento T3, después de 30 días de incubación.

#### e. Peso fresco

En el cuadro 6 se expresa el peso fresco promedio de *Musa sp.* var. Cavendish, evaluado a 30 días luego del cultivo *in vitro* en los diferentes tratamientos ensayados, observándose, que en el tratamiento control T0 se alcanzó el mayor valor promedio 2.29 g. Este promedio fue muy similar a los tratamientos T2 y T5 que alcanzaron 2.03 g y 2.25 g. Los tratamientos con el menor promedio en peso fresco fueron los tratamientos T9 y T10 que alcanzaron 1.12 y 1.17 g, respectivamente.

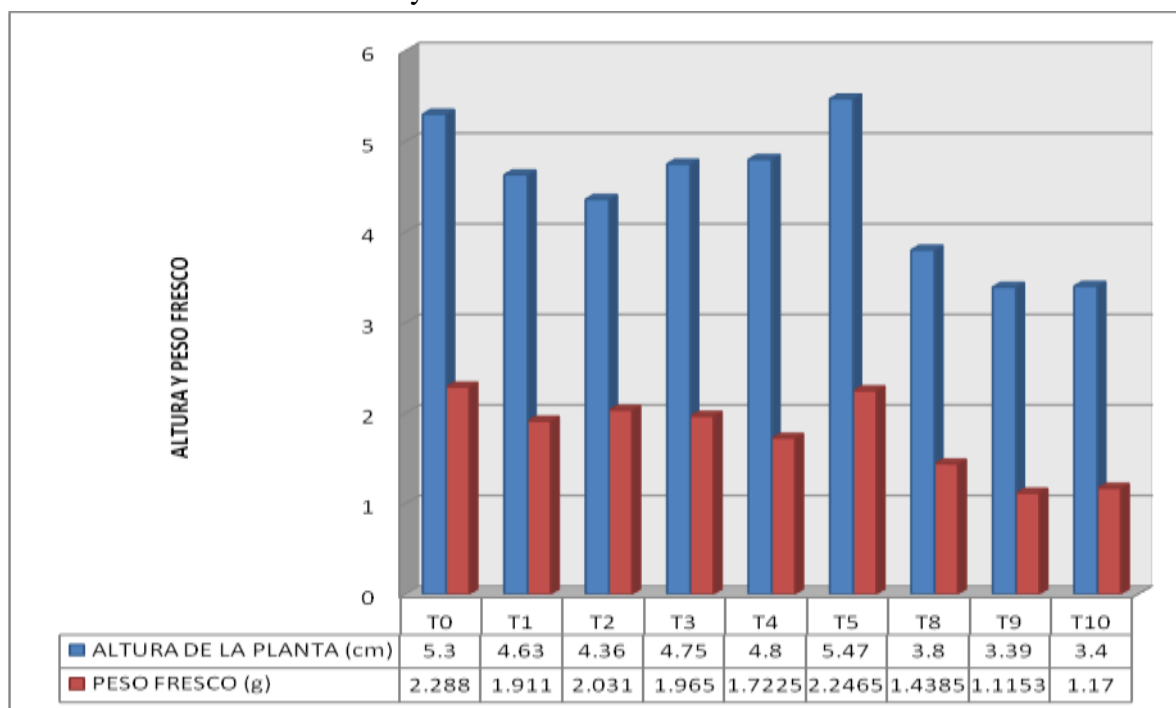
El análisis de varianza para el peso fresco, mostró significancia estadística para los tratamientos, el coeficiente de variabilidad fue 26.57% (Anexo 18).

La prueba de Duncan efectuada para la característica peso fresco con respecto a los tratamientos en estudio, mostró que el mayor valor lo obtuvo el tratamiento control T0 con 2.29 g, seguido del tratamiento T5, resultando estadísticamente iguales con el mismo grado de significancia. Estos tratamientos fueron estadísticamente superiores a los tratamientos T9 y T10 (Anexo 19).

Indudablemente, que las respuestas en el peso están ligadas al metabolismo de nutrientes y al almacenamiento de sustancias de reserva dentro de las yemas. En ese sentido, encontramos el caso del híbrido de cereza Inmil GM9, donde valores de peso fresco mayores, se correlacionaron con una mayor absorción de macroelementos en los tallos y por ende en su crecimiento y multiplicación (Djurdjina et al. 2001). Este comportamiento probablemente ocurrió en los brotes de banano frente a los dos tratamientos que mejor respondieron.

En la Figura 10 podemos observar la correlación entre el aumento de la altura y el aumento del peso fresco en los brotes de banano en cada uno de los tratamientos experimentados. La mejor respuesta fue presentada en los tratamientos que incluían 1/5  $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$  frente a los que contenían 1/10 de  $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ . Dentro del primer grupo se puede destacar el tratamiento T5, suplementado con 20% de agua de coco (AC), el cual no expresó diferencias significativas con el tratamiento control (T0).

**Figura 10.** Comparación entre la altura y el peso de plantas de *Musa sp.* var. Cavendish entre los diferentes tratamientos ensayados.



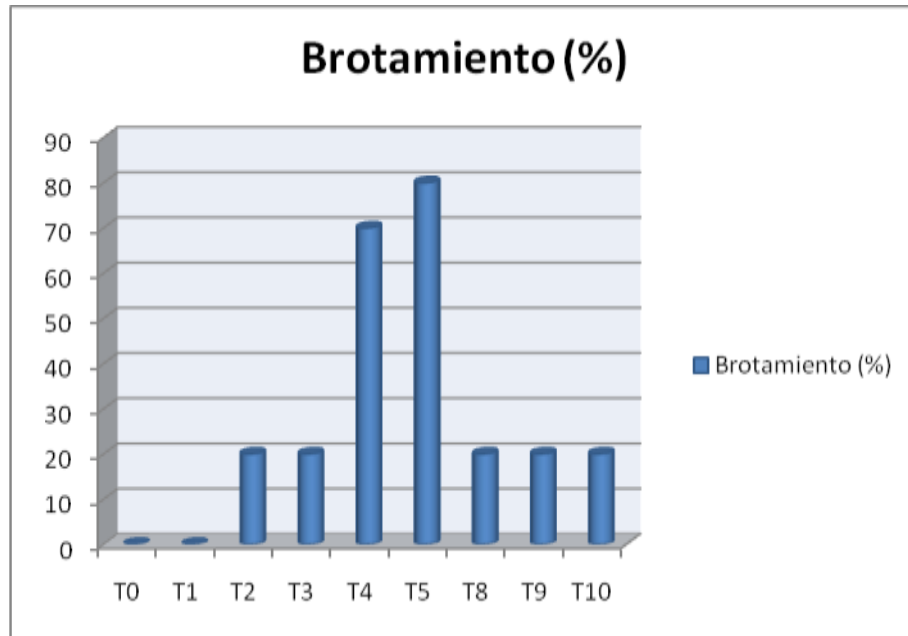
#### f. Brotamiento

En la Figura 11 podemos observar los porcentajes de plantas que se formaron brotes en esta etapa de enraizamiento, donde el mayor porcentaje lo tuvo el tratamiento T5 con 80% de brotamiento seguido del tratamiento T4 con 70% de brotamiento. Donde no se observó brotamiento alguno fue en el tratamiento control (T0) y el tratamiento T1. En la mayoría de los casos se presentaba un brote por planta pero en los tratamientos T4 y T5, este número de brotes pudo llegar de 2 a 5 brotes por planta.

En la Figura 12, se observa la presencia de brotes en la fase de enraizamiento, obteniéndose un mayor número de brotes en los tratamientos T4 y T5 que incluían agua de coco 10 y 20 %. La presencia de agua de coco, sin duda sería el responsable de este brotamiento. Como es conocido, este aditivo orgánico dentro de su composición química presenta citocininas como la Zeatina, Glucósido de zeatina y Ribósido de zeatina (Anexo 22) confiriéndole efectos similares a las hormonas responsables de la inducción de múltiple brotamiento, tal como lo han demostrado Colmenares y Giménez (2003) quienes observaron en la multiplicación de banano del cv. Williams (AAA) en medios con 1,5 mg/l de BA suplementado con agua de coco 20% (IM=2.4). Estos lograron índices de

multiplicación similares a los obtenidos en medios de cultivo con la concentración de BA 2,5 mg/l (IM=2.75), sugiriendo que el agua de coco podría suplementar e inclusive sustituir la hormona 6-Benziladenina (BA).

**Figura 11.** Brotamiento en la fase de enraizamiento en los diferentes tratamientos ensayados.



**Figura 12.** Brotamiento observado en *Musa sp.* var. Cavendish en fase de enraizamiento. Tratamiento T5, después de 30 días de incubación.

A manera de discusión general para la fase de enraizamiento, se asume que los diferentes tratamientos que presentaban 1/5  $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$  y 1/10 de  $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$  en su concentración total, es decir aproximadamente de 12 y 6 mM de nitrógeno, respectivamente, el crecimiento y desarrollo de las plantas fue óptimo en todos los tratamientos ensayados, aunque con tendencia a una disminución de la elongación, desarrollo del sistema radicular y peso fresco. Estos fenómenos fisiológicos se observaron mayormente en los tratamientos que presentaban la concentración de 1/10 de  $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ , hacia los 30 días de montada la fase de enraizamiento *in vitro*, lo que demostró la escasa concentración de nitrógeno (6 mM) disponible. Además, la presencia de los otros elementos mayores, potasio, magnesio y azufre, proporcionados por el fertilizante Sulpomag contribuyeron en la constitución de mejores plantas, así como también los micronutrientes proporcionados por el medio basal MS. La mejor respuesta fue presentada por el tratamiento T5 que presentaba 1/5  $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.1096 g/L Sulpomag y suplementado con agua de coco 20%, el cual no expresó diferencia significativa con el tratamiento control (T0), siendo muy superior en variables como tasa de crecimiento, número y tamaño de raíces. Esto también lo observó Sosa (1991) en el crecimiento de nudos de camote *in vitro* donde utilizó el fertilizante 12-12-12, obteniendo respuesta inclusive superior al tratamiento control.

### 4.3. Transferencia a suelo

La transferencia a suelo se ha realizado de manera exitosa, observándose una respuesta de sobrevivencia de 100% en plantas de todos los tratamientos ensayados. Estas plantas fueron aclimatadas y enraizadas definitivamente en el sustrato constituido por tierra de cultivo, tierra vegetal, compost y limo en una proporción 1:1:1:1. El riego utilizando agua destilada durante los primeros 7 días en cámara de alta humedad relativa 90%, fue muy importante para el endurecimiento de las plántulas antes de ir a condiciones de invernadero. De igual manera, la continuidad por 7 días del mismo sistema de riego, fue importante para evitar el quemado de las primeras hojas a consecuencia de la presencia de sales en el agua corriente.

Estas repuestas son muy similares a las observadas por Canchignia et al. (2007) quien obtuvo 80 % como el mayor porcentaje de supervivencia en el sustrato de tierra de cultivo en plantas de plátano var. Maqueño (*Musa balbisiana* AAB), Canchignia y Ramos (2004) demostraron en plátano Barragante la mayor sobrevivencia con 97 % en carboncillo. Además, Pérez (1998) indicó, que en la aclimatación de plátanos y bananos se han obtenido buenos resultados utilizando sustratos a base de humus de lombriz y Compost. Para el enraizamiento *ex vitro* de *Musaceae* no se requiere adicionar auxinas, ya que estas especies tienen la capacidad de sintetizar sus propias hormonas y poder formar sus raíces con mucha facilidad, toda vez que es una especie que se propaga vegetativamente de manera convencional.

Todas las plantas fueron ambientadas y transferidas a bolsas de polietileno conteniendo el sustrato: tierra de cultivo y arena en proporción de 2:1, colocadas en condiciones de campo abierto en el mismo invernadero, inicialmente se mostraron muy afectadas en su desarrollo, indudablemente debido a la presencia de sales en el agua de riego. Dificultad que fue superada, a medida que las plantas iban adecuándose a las nuevas condiciones de vida, las mismas que tendrán que asumir en la fase posterior cuando se las instale en campo definitivo. (Figura 13)



Figura 13. Acimatación de plantas de banano en *Musa sp.* var. Cavendish en invernadero.

## V. CONCLUSIONES

- De los tratamientos ensayados en la fase de brotación múltiple, el que mejor resultado presentó en el número y longitud de brotes de banano *Musa sp.* var. Cavendish *in vitro* fue el tratamiento T5 el cual presentaba 0.1096 g/L Sulpomag, 20% de agua de coco y 1/5  $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$  en su formulación.
- En la fase de enraizamiento, el tratamiento que mejores resultados presentó en las variables altura, tasa de crecimiento y peso fresco fue el tratamiento T5 el cual presentaba 0.1096 g/L Sulpomag, 20% de agua de coco y 1/5  $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$  en su formulación, sin embargo, en las variables número y tamaño de raíces, el que también obtuvo buenos resultados fue el tratamiento T3 el cual presentaba 0.1096 g/L Sulpomag, 500 mg/L de Caseína Hidrolizada y 1/5  $\text{KNO}_3 + \text{NH}_4\text{NO}_3$  en su formulación.
- En la transferencia a suelo se obtuvo 100% de sobrevivencia en el único sustrato experimentado, tierra agrícola: compost: tierra vegetal: limo en la proporción 1:1:1:1.



## **VI. RECOMENDACIONES**

1. Se recomienda ensayar el fertilizante inorgánico Sulpomag a diferentes concentraciones.
2. Ensayar una mayor concentración de agua de coco y caseína hidrolizada o conjuntamente el agua de coco y caseína hidrolizada, para ver si se obtiene una mejor respuesta en la etapa de multiplicación.
3. Ensayar otras fuentes de nitrógeno para enriquecer el medio de cultivo experimentado.
4. Evaluar la dosis efectiva de tratamiento con antibióticos por medio de antibiogramas y pruebas de dosis/tiempo.

## VII. RESUMEN

Se evaluó el uso del fertilizante Sulpomag y los aditivos orgánicos; Caseína hidrolizada (CH) y Agua de coco (AC) para la propagación clonal *in vitro* de banano (*Musa sp.* var. Cavendish), como alternativa de un medio de cultivo orgánico. Brotes de banano cultivadas *in vitro* en medio de cultivo MS se transfirieron a 10 combinaciones, ajustadas a la concentración de P, K y Mg del medio de cultivo MS. El medio MS se incluyó como testigo (T0). Los medios de cultivo ensayados fueron: a) (T1) Sulpomag + 1/5 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, b) (T2) Sulpomag + 1/5 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 250 mg/L CH, c) (T3) Sulpomag + 1/5 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 500 mg/L CH, d) (T4) Sulpomag + 1/5 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 10% AC, e) (T5) Sulpomag + 1/5 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 20% AC, f) Sulpomag + 1/10 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, g) Sulpomag + 1/10 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 250 mg/L CH, h) Sulpomag + 1/10 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 500 mg/L CH, i) Sulpomag + 1/10 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 10% AC, j) Sulpomag + 1/10 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 20% AC. Las condiciones de incubación se regularon a 22 °C de temperatura, 5 – 10 W.m<sup>-2</sup> de iluminación y 16/8 horas de fotoperiodo. En la fase de brotamiento múltiple se evaluó, cada 30 días la altura y número de brotes por 60 días, y en la fase de enraizamiento se evaluó, a 30 días la altura final, tasa de crecimiento, número y tamaño de raíces, y tamaño de raíces. Los mejores resultados se obtuvieron con el tratamiento (T5) Sulpomag + 1/5 KNO<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> + 20% AC. En los demás se observó una disminución del crecimiento de las plantas. La elongación del brote y el desarrollo del sistema radicular propiciaron una transferencia exitosa de plantas a condiciones de invernadero. Los resultados obtenidos permiten considerar la factibilidad de emplear el fertilizante Sulpomag y los aditivos orgánicos, como reemplazo de las sales minerales en la elaboración del medio de cultivo MS, para la propagación clonal *in vitro* de banano (*Musa sp.* var. Cavendish).

## VIII. LITERATURA CITADA

- **Agricultura Orgánica.** Palmira, Colombia. 2009. Consultado el 20 diciembre 2009. Disponible en <http://www.controlbiologico.com>
- **AGRODATA, Orgánicos.** Dirección de Agronegocios del Ministerio de la Agricultura. Lima-Perú. 2008. Consultado el 11 febrero 2010. Disponible en: <http://www.minag.gob.pe>
- Alvard, D. y Teisson C. 1993. **Comparison of methods of liquid medium for banana micropropagation.** Plant Cell Tiss Org. 32: 55-56.
- Amornwat, S. y Kanchanapoom, K. 2007. **Establishment of in vitro Culture of Musa AA Group ‘Kluai Sa’ and Musa AA Group ‘Kluai Leb Mue Nang’ and the Analysis of Ploidy Stability.** ScienceAsia 33: 437-442. Tailandia.
- Azofeifa, A. & et al. 2008. **Uso de Abonos foliares comerciales en la elaboración de medios de cultivo *in vitro*.** Universidad de Costa Rica. Agronomía Costarricense 32(2): 149-160.
- Ball, E. 1.946. **Development in sterile culture of stem tips and subadjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L.** Am. J. Bot. 33:301-318.
- Berg, L. y Bustamante, M. 1974. **Heat treatment and meristem culture for the production of virus free bananas.** Phytopathology 64: 320-322.
- Bower P. 1982. **Tissue Culture of bananas.** Int. Banana Nutr. Newslett. Bol. 5:10-11.
- Broomes V. 1990. **Micropropagation of selected plantain (*Musa sp*) clones as influenced by medium composition and culture conditions.** Amsterdam-Holanda.

- Buro Hernández. 2001. **Validación del Protocolo de Micropropagación de Musáceas en Cinco Líneas Comerciales Pertenecientes al Clon Williams.** Costa Rica.
- Caplin S. y Steward F. 1948. **Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root.** *Science* 108:655-657.
- Canchignia, F. y Ramos, L. 2004. **Micropropagación de plátano variedad Barragante.** Laboratorio de Biotecnología vegetal, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador.
- Canchignia H. Sigcha, L., Toaquiza, J., Ramos, L., Saucedo, S., Carranza, M. y Cevallos O. 2007. **Alternativas para la Propagación *in vitro* de Plátano Variedad Maqueño (*Musa balbisiana* AAB).** Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Ecuador.
- Carrazana, D., Herrera, L., Franco, C., García, M., Delgado, M., y Ramos N. 2006. ***Bacillus subtilis*, contaminante bacteriano en la micropropagación de bananos (cv. FHIA-18, AAAB).** Centro Agrícola, 33(3): 25-30. Cuba.
- Castro D., Díaz J. y Montoya N. 2002. **Propagación clonal de bananos en Biorreactores de Inmersión Temporal.** Universidad Católica de Oriente, Colombia
- Colmenares M. y Giménez C. 2000. **Nuevas Estrategias para la Inducción de Brotes en Musáceas.** Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad del Zulia. Venezuela.
- ----- . 2001. **New strategies for shoot induction in Musa.** IV Latin-American Meeting on Plant Biotechnology REDBIO 2001. 4 al 8 de Junio de 2001. Goiania-Goiás, Brasil.

- -----, 2003. **Multiplicación *in vitro* de *Musa spp.* mediante Sistema de Inmersión Temporal.** Rev. Fac. Agron. (LUZ). 20: 468-477. Venezuela.
- Cronauer, S. y Krikorian, A. 1984. **Somatic embryos from Cultured tissue of triploid plantains (*Musa- AAB*).** Plant. Cell. Rep. 2:321-328.
- Djurdjina R., Sarić M., Cerović R. y Čulafić L. 2001. **Changes in macroelement content of the media and in sweet cherry Inmil GM9 shoots during *in vitro* culture.** Journal of Horticultural Science and Biotechnology 76:295-299.
- Decreto Supremo N° 044-2006 AG, **Reglamento Técnico para los Productos Orgánicos.** 2006. Perú.
- Ganapathi T., Mohan J., Suprasana P., Bapat V. y Rao A. 1995. **A low-cost strategy for *in vitro* propagation of banana.** Current Science 68:646-650.
- George E. 1996. **Plant propagation by tissue culture part 2.** In practice. 2nd edition. Exegenetics Limited England pp. 1031-1034.
- Guerra D., Vásquez S., Espinosa W. y Marcelino L. 2002. **Respuesta a la Micropropagación *in vitro* de Cuatro Variedades de Plátano (*Musa AAB*) con diferentes Fuentes de Carbono y Antioxidantes.** Panamá.
- Gribble K., Conroy J., Holford P. y Milham P. 2002. ***In vitro* uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation.** Australian Journal of Botany 50:713-723.
- Grisales, F. 1994. Técnica rápida de multiplicación de plátano en Colombia. INFOMUSA. (FR) 3 (2):7.
- Guzman E. 1975. **Project on production of mutants by irradiation of *in vitro* culture tissue of coconut and bananas and their mass propagation by the tissue culture technique.** Tec. Doc. 173, Imp. Veg. Prop. Plants Induced Muta. pp53-76. Vienna

- Gübbük H.y Pekmezcü. M. 2004. ***In Vitro* Propagation of Some New Banana Types (Musa spp.)**. Turk J Agric For 28: 355-361.
- Hardy, I. y E. García 1994. **Micropropagación de bananos (Musa AAA) del subgrupo Cavendish**. YTON 55: 31-41.
- Kirby, P., Leustek, T. y Lee, M. 1987. **Nitrogen nutrition**. Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. I. J.M. Bonga y D.J. Durzan (Edit.) Martinus Nijhoff Publishers. pp 67-88.
- Leifert, C y Waites W. 1993. **Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points**. Physiology, Growth and development of Plant in Culture, pp 278-283.
- Llatas Quiroz. 2005. **Botánica Fanerogámica**. pp 280-281. Lambayeque-Perú.
- Ma S., Shii C. y Chin. J. 1972. **In vitro formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation**. Soc. Hort. Sci. 18: 135-142.
- ----- . 1974. **Growing banana plantlets from adventions buds**. Soc. Hort. Sci. 20:6-12.
- Mirabal, D. 2005. Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba.
- Moutia, M. y Dookun A. 1999. **Evaluation of surface sterilization and hot water treatment on bacterial contaminants in bud culture of sugar cane**. Expl. Agric.35: 265-274
- Moreno D. y Menchaca G. 2007. **Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación in vitro de Stanhopea tigrina Bateman (Orchidaceae)**. Universidad Veracruzana, Mexico. Foresta Veracruzana 9(02): 27-32.

- Murashige T. y Skoog F. 1962. **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.** *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Niedz R. y Evens T. 2007. **Regulating plant tissue growth by mineral nutrition.** *In Vitro Cellular and Developmental Biology–Plant* 43:370-381.
- Ortiz R 1993. **Plantain and Banana research at the International Institute of Tropical Agriculture.** *HortScience* 28 (9): 874-970.
- Pérez, P. 1998. **Propagación y mejora genética de plantas por biotecnología.**
- Pierick R. 1990. **Cultivo *in vitro* de las Plantas Superiores.** Ediciones Mundi Prensa. Madrid. 324p.
- Pollock M. y Oppenheimer D. 1999. **Inexpensive alternative to MS medium for selection of Arabidopsis plants in culture.** *Bio/Techniques* 26:254-257.
- Portal, N., Caraballosa, I., Alvarado Y. y Leiva, M. 2003. **Bacterias contaminantes en la fase de establecimiento in vitro del guayabo.** *Biotecnología vegetal*3(2): 169 - 172. Cuba.
- Portero Ramirez M. 1991. **Propagación clonal mediante el cultivo de ápices e inducción de callos en platano (*Musa sp*) in vitro.** Lambayeque, Perú.
- Rodríguez Flores. 2000. **Germinación y desarrollo de *Paphiopedilum exstaminodium* y *P. caudatum*, especies en peligro de extinción.** Tesis de Maestría. UNAN.
- Romero, R., Bárbara, S. Rosales, L. y Barba, A. 2007. **Uso de Complejos Comerciales como sustitutos de componentes del Medio de Cultivo en la Propagación in vitro de *Laelia anceps*.** *LANKESTERIANA* 7(1-2): 353-356.

- Rowe, P. y Richardson, D. 1975. **Breeding bananas for disease resistance, fruit quality and yield.** Trop. Agric. Res Ser SIATSA, Bull 2: 1-144. Honduras.
- Sepúlveda, N., Murillo, M. y Medina M., 2008. **Propagación *in vitro* de Musáceas del Chocó a partir del cultivo de meristemas radiculares.** Inv., Biod. Y Desarr. 2008; 27(1): 96-99.
- Sosa Amay R. 1991. **Efecto de los fertilizantes convencionales Urea, 12-12-12 y Nitrofoska Foliar en el crecimiento de nudos de camote (*Ipomoea batatas* LAM) *in vitro*.** Lambayeque, Perú.
- Tezenas Du Monteel H. 1985. **Le bananier plantain.** Malsone. Paris: Uve y Larouse; 143 p
- Thomas, P. 2004. **A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures.** Current Science, 87(1).
- Van den Houwe, I. 1998. Elimination of endophytic bacteria from banana tissue cultures. Annual Report INIBAP, pp. 12
- Vasil I.K. 2008. **A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schlieden and Schwann to biotech crops.** Plant Cell Reports 27:1423-1440.
- Vessey, J. y Rivera J. 1981. **Meristem culture of bananas.** Turrialba 31: 161-163.
- Vuylsteke, D. y E. De Langhe. 1985. **Feasibility of In vitro propagation of bananas and plantains.** Trop Agr
- -----, 1988. **Shoot-tip propagation, conservation y distribution of Musa germoplasm.** Rome: IBPGR. 55p.
- Williams, R., Taji, M. y Kibbler, H. 1990. **Mineral Nutrition *in vitro*.** VII International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. A3-106. pp109. Ámsterdam.



## ANEXOS:

### ANEXO 1. Formulación de los diferentes medios de cultivos ensayados

El Sulpomag está formulado de la siguiente manera:

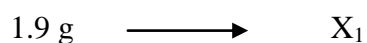
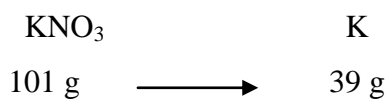
Potasio soluble ( $K_2O$ )	22.0 %
Magnesio ( $MgO$ )	22.0 %
Azufre ( $S$ )	18.0 %

Entonces el Sulpomag contiene 22% de magnesio ( $Mg$ ) y en las sales inorgánicas MS el sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) tiene un peso molecular de 150 g donde el peso del átomo de magnesio presente en la fórmula es de 24 g y la concentración del  $MgSO_4$  en las sales inorgánicas MS es de 370 mg/L (0.37 g/L) por lo tanto (Sosa, 1991):

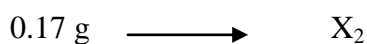
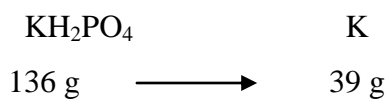
$$\begin{array}{rcl} MgSO_4 \cdot 7H_2O & & Mg \\ 150 \text{ g} & \longrightarrow & 24 \text{ g} \\ 0.37 \text{ g} & \longrightarrow & X \\ X = 0.0592 \text{ g de Mg presentes en MS} \end{array}$$
$$\begin{array}{rcl} Sulpomag & & Mg \\ 100 \text{ g} & \longrightarrow & 22 \text{ g} \\ X & \longrightarrow & 0.0592 \text{ g} \\ \mathbf{X = 0.269091 \text{ g de Sulpomag}} \end{array}$$

Los mismos conceptos los aplicamos en el caso del azufre ( $S$ ) y del potasio ( $K$ );

$$\begin{array}{rcl} MgSO_4 \cdot 7H_2O & & S \\ 150 \text{ g} & \longrightarrow & 32 \text{ g} \\ 0.37 & \longrightarrow & X \\ X = 0.078933 \text{ g de S presentes en MS} \end{array}$$
$$\begin{array}{rcl} Sulpomag & & S \\ 100 \text{ g} & \longrightarrow & 18 \text{ g} \\ X & \longrightarrow & 0.078933 \\ \mathbf{X = 0.438517 \text{ g de Sulpomag}} \end{array}$$



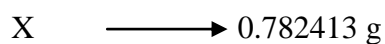
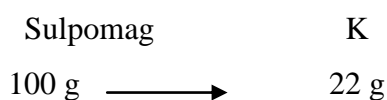
$$X_1 = 0.733663 \text{ g de K}$$



$$X_2 = 0.04875 \text{ g de K}$$

$$\Rightarrow [\text{K}] = X_1 + X_2$$

$$[\text{K}] = 0.782413 \text{ g de K}$$



$$\mathbf{X = 3.556423 \text{ g de Sulpomag}}$$

Encontrado los pesos del Sulpomag para cada caso, se relaciono entre los tres componentes principales del fertilizante; con respecto al K, el Sulpomag contiene 3.556 g y teniendo las concentraciones del potasio, magnesio y azufre obtuvimos por regla de tres simples el peso de cada elemento;

Composición del Sulpomag		Peso para cada componente
K	22%	0.7824 g
Mg	22%	0.7824 g
S	18%	0.6401 g

Luego se hallo la relación del potasio con los otros elementos para observar en cuanto aumenta o disminuye la concentración con respecto a las sales inorgánicas MS:

	MS	Sulpomag
Mg	0.0592 g	0.7824 g
Relación	1:13.2	
S	0.0789 g	0.6401 g
Relación	1:8.1	

De la misma forma lo aplicamos para el caso del azufre (S) y del potasio (K);

Con respecto al S, el Sulpomag contiene 0.439 g

<b>Composición del Sulpomag</b>		<b>Peso para cada componente</b>
K	22%	0.0966 g
Mg	22%	0.0966 g
S	18%	0.0789 g

La relación del azufre con los otros elementos es:

	<b>MS</b>	<b>Sulpomag</b>
Mg	0.0592 g	0.0966 g
Relación	1:1.6	
K	0.7824 g	0.0966 g
Relación	1:0.123	

Con respecto al Mg, el Sulpomag contiene 0.269 g

<b>Composición del Sulpomag</b>		<b>Peso para cada componente</b>
K	22%	0.0592 g
Mg	22%	0.0592 g
S	18%	0.0482 g

La relación del magnesio con los otros elementos es:

	<b>MS</b>	<b>Sulpomag</b>
S	0.0789 g	0.0482 g
Relación	1:0.6	
K	0.7824 g	0.0592 g
Relación	1:0.07	

**ANEXO 2.** Análisis de varianza para el número de brotes de banano *Musa sp.* var. Cavendish a 30 días del brotamiento *in vitro*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	69,409	10	6,941	5,615	,000
<b>Intra-grupos</b>	149,583	121	1,236		
<b>Total</b>	218,992	131			

C.V.: 37.18%

**ANEXO 3.** Prueba de Duncan para el número de brotes de banano *Musa sp.* var. Cavendish a 30 días del brotamiento *in vitro*.

	Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan <sup>a</sup>	T7	12	1,67			
	T6	12	1,92			
	T8	12	2,58	2,58		
	T1	12		2,92		
	T5	12		2,92		
	T10	12		3,00	3,00	
	T2	12		3,08	3,08	
	T9	12		3,17	3,17	
	T3	12		3,50	3,50	3,50
	T4	12			4,00	4,00
	T0	12				4,17
	<b>Sig.</b>		,058	,084	,050	,169

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12.000.

**ANEXO 4.** Análisis de varianza para el número de brotes de banano *Musa sp.* var. Cavendish a 60 días del brotamiento *in vitro*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	97,667	10	9,767	5,174	,000
<b>Intra-grupos</b>	228,417	121	1,888		
<b>Total</b>	326,083	131			

C.V.: 33.68%

**ANEXO 5.** Prueba de Duncan para el número de brotes de banano *Musa sp.* var. Cavendish a 60 días del brotamiento *in vitro*.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
<b>Duncan<sup>a</sup></b>					
T7	12	2,50			
T8	12	3,08	3,08		
T6	12	3,25	3,25		
T1	12		3,83	3,83	
T2	12		3,83	3,83	
T9	12		4,08	4,08	
T10	12		4,25	4,25	4,25
T4	12			4,75	4,75
T3	12			4,83	4,83
T0	12			5,08	5,08
T5	12				5,42
<b>Sig.</b>		,211	,070	,055	,065

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12.000.

**ANEXO 6.** Análisis de varianza para la altura de brotes de banano *Musa sp.* var. Cavendish a 30 días del brotamiento *in vitro*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	5,526	10	,553	9,912	,000
<b>Intra-grupos</b>	6,746	121	,056		
<b>Total</b>	12,272	131			

C.V.: 20.15%

**ANEXO 7.** Prueba de Duncan para el número de brotes de banano *Musa sp.* var. Cavendish a 30 días del brotamiento *in vitro*.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
<b>Duncan<sup>a</sup></b>					
T10	12	,88667			
T9	12	,89583			
T6	12	,99917			
T1	12	1,02975	1,02975		
T3	12	1,03667	1,03667		
T0	12		1,21333	1,21333	
T4	12		1,22417	1,22417	
T2	12			1,34517	1,34517
T5	12			1,41817	1,41817
T8	12			1,42500	1,42500
T7	12				1,44667
<b>Sig.</b>		,171	,067	,051	,345

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12.000.

**ANEXO 8.** Análisis de varianza para la altura de brotes de banano *Musa sp.* var. Cavendish a 60 días del brotamiento *in vitro*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	6,500	10	,650	6,268	,000
<b>Intra-grupos</b>	12,548	121	,104		
<b>Total</b>	19,048	131			

C.V.: 23.66%

**ANEXO 9.** Prueba de Duncan para la altura de brotes de banano *Musa sp.* var. Cavendish a 60 días del brotamiento *in vitro*.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
<b>Duncan<sup>a</sup></b>						
T6	12	,95275				
T7	12	1,14025	1,14025			
T10	12	1,17083	1,17083	1,17083		
T9	12	1,22333	1,22333	1,22333		
T3	12		1,36300	1,36300	1,36300	
T4	12		1,41433	1,41433	1,41433	
T2	12			1,44117	1,44117	
T1	12			1,45000	1,45000	
T8	12			1,45825	1,45825	
T5	12				1,57500	1,57500
T0	12					1,80683
<b>Sig.</b>		,061	,064	,060	,164	,080

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 12.000.

**ANEXO 10.** Análisis de varianza para la altura final de las plantas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en la fase de enraizamiento *in vitro*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	46,620	8	5,827	11,112	,000
<b>Intra-grupos</b>	42,480	81	,524		
<b>Total</b>	89,100	89			

C.V.: 16.33%

**ANEXO 11.** Prueba de Duncan para la altura final de las plantas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en la fase de enraizamiento *in vitro*.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
<b>Duncan<sup>a</sup></b>						
T9	10	3,390				
T10	10	3,400				
T8	10	3,800	3,800			
T2	10		4,360	4,360		
T1	10			4,630	4,630	
T3	10			4,750	4,750	
T4	10			4,800	4,800	4,800
T0	10				5,300	5,300
T5	10					5,470
<b>Sig.</b>		,237	,088	,222	,061	,053

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000.



**ANEXO 12.** Análisis de varianza para la tasa de crecimiento de las plantas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en la fase de enraizamiento *in vitro*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	27,750	8	3,469	5,378	,000
<b>Intra-grupos</b>	52,246	81	,645		
<b>Total</b>	79,996	89			

C.V.: 32.41%

**ANEXO 13.** Prueba de Duncan para la tasa de crecimiento de las plantas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en la fase de enraizamiento *in vitro*.

	Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	3
<b>Duncan<sup>a</sup></b>	T10	10	1,640		
	T9	10	1,760		
	T8	10	2,070	2,070	
	T0	10	2,390	2,390	
	T2	10		2,590	
	T3	10		2,670	
	T1	10		2,830	2,830
	T4	10		2,830	2,830
	T5	10			3,520
	<b>Sig.</b>			,059	,066

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000.

**ANEXO 14.** Análisis de varianza para el número de raíces de las plantas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en la fase de enraizamiento *in vitro*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	154,400	8	19,300	6,866	,000
<b>Intra-grupos</b>	227,700	81	2,811		
<b>Total</b>	382,100	89			

C.V.: 19.89%

**ANEXO 15.** Prueba de Duncan para el número de raíces de las plantas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en la fase de enraizamiento *in vitro*.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
<b>Duncan<sup>a</sup></b>						
T9	10	6,60				
T10	10	6,90	6,90			
T8	10	7,30	7,30	7,30		
T0	10	8,00	8,00	8,00	8,00	
T4	10		8,30	8,30	8,30	
T1	10			8,80	8,80	8,80
T5	10				9,30	9,30
T2	10					10,30
T3	10					10,40
<b>Sig.</b>		,092	,092	,070	,118	,053

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000.

**ANEXO 16.** Análisis de varianza para el tamaño de raíces de las plantas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en la fase de enraizamiento *in vitro*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	4324,016	8	540,502	3,096	,004
<b>Intra-grupos</b>	14140,108	81	174,569		
<b>Total</b>	18464,124	89			

C.V.: 29.28%

**ANEXO 17.** Prueba de Duncan para el tamaño de raíces de las plantas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en la fase de enraizamiento *in vitro*.

	Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
<b>Duncan<sup>a</sup></b>	T9	10	36,390	
	T4	10	37,440	
	T10	10	38,670	
	T0	10	41,460	41,460
	T8	10	41,980	41,980
	T2	10	49,500	49,500
	T1	10		53,390
	T3	10		53,400
	T5	10		53,850
	<b>Sig.</b>			,054

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000.

**ANEXO 18.** Análisis de varianza para el peso fresco de las plantas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en la fase de enraizamiento *in vitro*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<b>Inter-grupos</b>	15,220	8	1,902	8,659	,000
<b>Intra-grupos</b>	17,796	81	,220		
<b>Total</b>	33,016	89			

C.V.: 26.57%

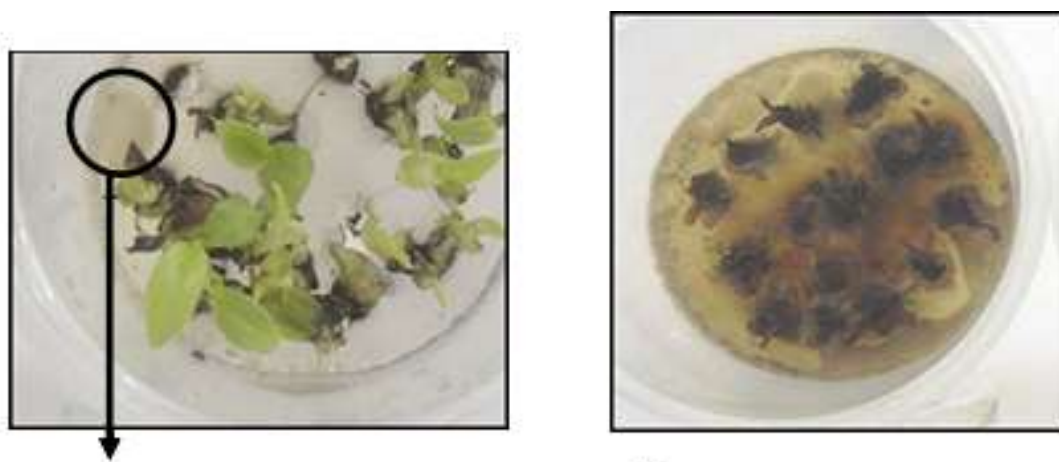
**ANEXO 19.** Prueba de Duncan para el tamaño de raíces de las plantas de banano *Musa sp.* var. Cavendish en la fase de enraizamiento *in vitro*.

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
<b>Duncan<sup>a</sup></b>					
T9	10	1,11530			
T10	10	1,17000			
T8	10	1,43850	1,43850		
T4	10		1,72250	1,72250	
T1	10			1,91100	1,91100
T3	10			1,96500	1,96500
T2	10			2,03100	2,03100
T5	10				2,24650
T0	10				2,28800
<b>Sig.</b>		,150	,179	,185	,113

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 10.000.

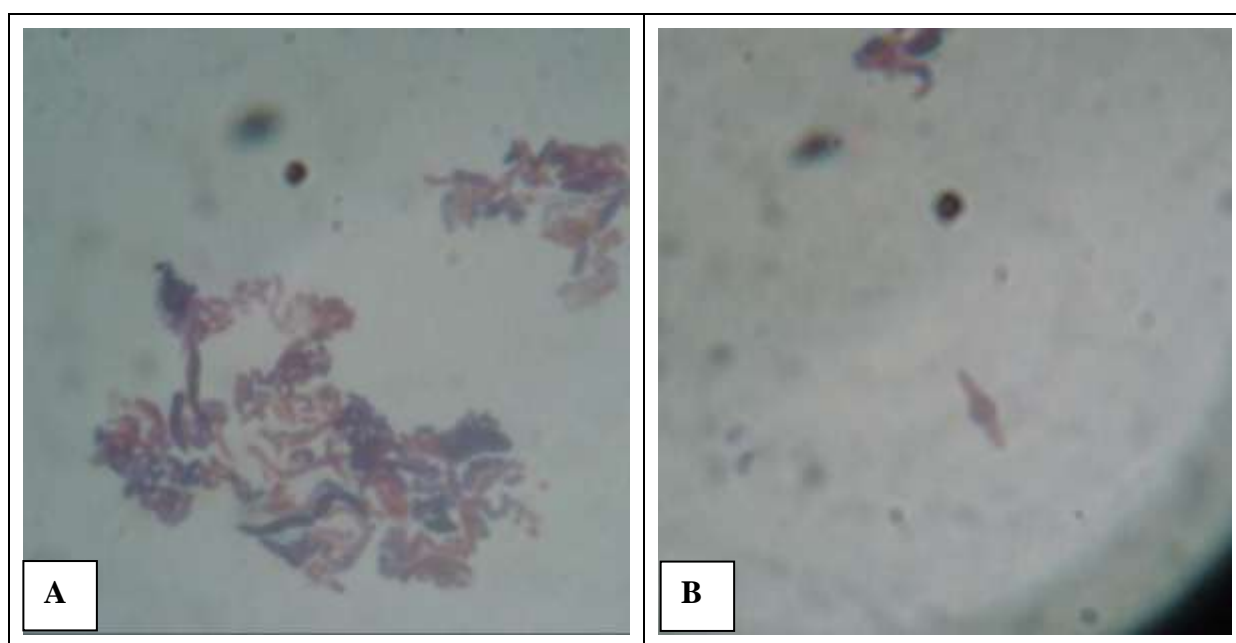
**ANEXO 20.** Esquema proporcionado por la doctora Daymi Carranza, el cual presenta en su trabajo de investigación; *Bacillus subtilis*, contaminante bacteriano en la micropropagación de bananos (cv. FHIA-18, AAAB)



Colonias bacterianas aisladas, separadas de las plantas *in vitro*

Crecimiento bacteriano en todo el medio de cultivo. Necrosis de las plantas *in vitro*

**ANEXO 21.** Observación Microscópica del aislado bacteriano; A. Colonias bacilares Gram positivas, B. Presencia de endosporas.



ANEXO 22. Algunos componentes orgánicos del agua de coco (AC) (Krikorian, 1991).

---

**Aminoácidos**

Aspártico, glutámico  
Serina, aminobutírico  
Asparagina, glicina  
 $\beta$ -Alanina, treonina  
Histidina, glutamina  
Arginina, lisina  
Valina, metionina  
Tirosina, prolina, hidroxiprolina  
Homoserina  
Fenilalanina

**Otros compuestos nitrogenados**

Amonio, etanolamina  
Dihidroxifenilalanina

**Ácidos orgánicos**

Shikimico, quínico  
Pirrolidona-carboxílico  
Succínico, málico  
Cítrico y desconocidos

**Azúcares**

Sacarosa  
Frutuosa

**Alcoholes de azúcar**

Sorbitol  
m-Inositol  
siloinositol

**Vitaminas**

Ácido nicotínico  
Ácido pantoténico  
Biotina  
Rivoflavina  
Ácido fólico  
Tiamina  
Piridoxina  
Ácido ascórbico

**Sustancias de crecimiento**

Auxina  
Giberelinas  
1,3-Difenilurea  
Zeatina  
Glucósido de zeatina  
Ribósido de zeatina

**Otros**

ARN-polimerasa  
Uracilo, adenina  
Leucoantocianinas  
Fosfatasa ácida  
Diastasa  
Deshidrogenasa  
Peroxidasa, Catalasa

**Anexo 23.** Componentes nitrogenados de la caseína hidrolizada<sup>a</sup> con ácidos y con enzimas (Krikorian, 1991).

Componentes	Contenido según hidrólisis (mg/100mg CH)			
	En hidrólisis ácida		En hidrólisis enzimática	
	Aminoácido	N	Aminoácido	N
Ácido cisteico	Presente	---	Presente	---
Ácido aspártico	4.18	0.435	0.836	0.088
Ácido glutámico	10.80	1.030	3.550	0.338
Serina	2.39	0.319	2.250	0.300
Glicina	2.18	0.405	0.334	0.062
Treonina	3.32	0.390	1.490	0.175
Alanina	1.63	0.257	1.380	0.217
Histidina	1.39	0.376	0.403	0.109
Lisina	3.35	0.642	2.810	0.538
Arginina	1.08	0.347	0.836	0.269
Metionina	1.02	0.096	1.270	0.119
Prolina	4.65	0.566	0.941	0.115
Valina	3.23	0.836	3.080	0.368
Isoleucina	1.22	0.130	2.150	0.230
Leucina	3.32	0.352	3.910	0.418
Fenilalanina	1.10	0.093	2.530	0.215
Triptófano	0.00	---	2.040	0.280
Tirosina	0.181	0.014	1.540	0.119
Amoníaco	0.509	0.419	0.208	0.171
<b>Total</b>	<b>45.50</b>	<b>6.26</b>	<b>31.56</b>	<b>4.13</b>

a. se expresan en términos de mg de aminoácidos o mg de N por 100 mg de CH. Las determinaciones se efectuaron.