

Establecimiento *in vitro* de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) cv. “Curaré enano”

Shajid Mark Osorio Vega

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano

Honduras

Noviembre, 2019

ZAMORANO
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Establecimiento *in vitro* de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) cv. “Curaré enano”

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por:

Shajid Mark Osorio Vega

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2019

Establecimiento *in vitro* de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) cv. Curaré enano

Shajid Mark Osorio Vega

Resumen. La demanda de plantas libres de enfermedades ha incrementado, con esto la necesidad de cultivos asépticos y la optimización de protocolos de micropropagación. Se realizaron dos experimentos de termoterapia; en el experimento 1 se evaluó cuatro tratamientos de termoterapia a baño maría: 55 °C × 10 o 15 minutos (T1 y T2), 35 °C × 10 minutos (T3), 33 °C × 15 minutos (T4), en el experimento 2 se evaluó termoterapia en un horno a 38 °C por 5 o 7 días. Para ambos experimentos se evaluó el porcentaje de contaminación y sobrevivencia de los explantes tratados y se utilizó un DCA. En el experimento con baño maría, el mejor tratamiento fue 33 °C x 15 minutos con un 0% de contaminación. Mientras que la termoterapia en horno tuvo un 100% de contaminación. Se obtuvo un mayor número de meristemos apicales asépticos en los tratamientos termoterapia 55 °C × 10 minutos, 35 °C × 10 minutos y 33 °C × 15 minutos. Para la optimización de protocolo se evaluó el efecto del BAP a 0, 4 o 20 mg/L y AIA 0 o 0.2 mg/L en el establecimiento *in vitro* de meristemos. Para este experimento se utilizó un DCA con arreglo factorial. Se evaluó el número de estructuras que podrían ser brotes por explante. El día 68 se observó efecto del BAP y de la interacción BAP×AIA. Los meristemos apicales presentaron un mayor número de brotes probables en el medio de cultivo suplementado con 4 mg/L de BAP + 0.2 mg/L de AIA.

Palabras claves: Baño maría, fitohormonas, meristemos apicales, micropropagación, temperatura.

Abstract. The demand for disease-free plants has increased, with this the need for aseptic cultures and the optimization of micropropagation protocols. Two thermotherapy experiments were performed; in the first experiment four thermotherapy treatments were evaluated in a water bath: 55 °C × 10 or 15 minutes (T1 and T2), 35 °C × 10 minutes (T3), 33 °C × 15 minutes (T4), in the second experiment however, thermotherapy was evaluated in an oven at 38 °C for 5 or 7 days. For both experiments, the percentage of contamination and survival of the treated explants were evaluated and a DCA was used. In the water bath experiment the best treatment was 33 °C x 15 minutes with 0% contamination. While oven thermotherapy had 100% contamination. A greater number of aseptic apical meristems were obtained in the thermotherapy treatments 55 °C × 10 minutes, 35 °C × 10 minutes and 33 °C × 15 minutes. For the protocol optimization, the effect of BAP at 0, 4 or 20 mg / L and AIA 0 or 0.2 mg/L in the *in vitro* establishment of meristems was evaluated. In this experiment a DCA with factorial arrangement was used. The number of structures that could be shoots per explant were evaluated. On day 68, the effect of the BAP and the BAP × AIA interaction was observed. The apical meristems presented a greater number of probable outbreaks in the culture medium supplemented with 4 mg/L of BAP + 0.2 mg/L of AIA.

Keywords: Apical meristems, micropropagation, phytohormones, temperature, water bath.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES	17
5. RECOMENDACIONES	18
6. LITERATURA CITADA.....	19

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Medio de cultivo de Murashige y Skoog (MS) modificado para establecimiento <i>in vitro</i> de meristemos de plátano cv. Curaré enano.....	4
2. Tratamientos de termoterapia con baño maría previo al establecimiento <i>in vitro</i> de meristemos de plátano	7
3. Tratamientos termoterapia en horno previo al establecimiento <i>in vitro</i> de meristemos de plátano.	7
4. Dosis de 6-Benciaminopurina (BAP) y Ácido indoleacético (AIA) evaluados para el establecimiento <i>in vitro</i> de meristemos de plátano cv. Curaré enano	8
5. Porcentaje de explantes contaminados de meristemos apicales de plátano (<i>Musa × paradisiaca L.</i>) variedad Curaré enano en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a los tratamientos de termoterapia a través de la aplicación de calor húmedo utilizando el método baño maría.....	10
6. Porcentaje de explantes sobrevivientes de meristemos apicales de plátano (<i>Musa × paradisiaca L.</i>) variedad Curaré enano en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a los tratamientos de termoterapia utilizando el método baño maría.....	11
7. Porcentaje de explantes contaminados de meristemos apicales de plátano (<i>Musa × paradisiaca L.</i>) variedad Curaré enano en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a los tratamientos de termoterapia a través de la aplicación de calor utilizando un horno incubador.....	12
8. Porcentaje de explantes sobrevivientes de meristemos apicales de plátano (<i>Musa × paradisiaca L.</i>) variedad Curaré enano en la etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a los tratamientos de termoterapia a través de la aplicación de calor seco utilizando un horno incubador.	13
9. ANOVA de número de brotes probables de plátano (<i>Musa × paradisiaca L.</i>) variedad Curaré enano en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a las fitohormonas BAP y AIA.	14
10. Número de brotes probables por meristemo apical de plátano (<i>Musa × paradisiaca L.</i>) variedad Curaré enano en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a 6-Bencilaminopurina (BAP) suplementado en medio MS	14
11. Número de brotes probables por meristemo apical de plátano (<i>Musa × paradisiaca L.</i>) variedad Curaré enano en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a Ácido indoleacético (AIA) suplementado en medio MS.....	15

12. Número de brotes probables por meristemo apical de plátano (<i>Musa × paradisiaca L.</i>) variedad Curaré enano en etapa de establecimiento <i>in vitro</i> como respuesta a 6-Bencilaminopurina (BAP) × Ácido indoleacético (AIA) suplementado en diferentes concentraciones en el medio MS	16
--	----

Figuras	Página
1. Cortes primarios y eliminación de las hojas apicales de la plántula de <i>Musa × paradisiaca L.</i> A) Plántula extraída de sustrato y un corte transversal eliminando hojas apicales. B) Corte del cormo basal eliminando raíces. C) Corte del pseudotallo reduciéndolo a una altura aproximada de 15 cm.....	5
2. Cortes secundarios realizados en los cormos de <i>Musa paradisiaca L.</i> para su segunda reducción dentro del laboratorio. A) Reducción de la longitud del pseudotallo a una altura aproximada de 8-10 cm. B) Cromo basal reducido a través de cortes transversales a un anchor aproximado de 3 cm.	5
3. Cortes y eliminación del pseudotallo de <i>Musa × paradisiaca L.</i> antes del establecimiento <i>in vitro</i> . A) Segunda reducción del explante dentro del laboratorio, B) Corte longitudinal de las hojas que cubren el pseudotallo dentro de la cámara de flujo laminar, C) Meristemo apical establecido <i>in vitro</i>	6
4. Tratamientos térmicos en el explante de la <i>Musa × paradisiaca L.</i> antes de la tercera reducción. A) Tratamiento térmico de calor controlado dentro de un horno incubador, B) Tratamiento térmico en baño maría controlado por el equipo calentador Isotemp.....	6
5. Explantes de plátano (<i>Musa × paradisiaca L.</i>) establecidos <i>in vitro</i> luego de tratamientos de termoterapia a través del método baño maría. Explantes muertos A) 55 °C x 15 minutos. Explantes vivos B) 33 °C x 15 minutos. C) 38 °C x 5 minutos	11
6. Brotes probables de plátano (<i>Musa × paradisiaca L.</i>) establecidos <i>in vitro</i> en medio de cultivo MS. A) Medio sin fitohormonas. B) 4 mg/L BAP. C) 20 mg/L BAP. D) 0.2 mg/L AIA. E) 4 mg/L BAP + 0.2 mg/L AIA. F) 20 mg/L BAP + 0.2 mg/L AIA.....	13

1. INTRODUCCIÓN

El plátano (*Musa × paradisiaca L.*) pertenece a la familia de las musáceas y es un cultivo tropical perenne originario del sudeste asiático, concretamente de la India, siendo conocido en el Mediterráneo después de la conquista de los árabes en el año 650 d.C. (Robinson y Saúco 2012).

En Honduras una de las variedades mayormente cultivadas debido a su demanda son las variedades Cuerno y Curaré Enano. El Curaré Enano es la variedad con la mayor aceptación en el país ya que tiene un mejor rendimiento de campo, pero con las mismas características organolépticas del Cuerno (Lardizábal y Gutiérrez 2006).

La utilización del plátano como alimento ha venido incrementando su valor económico, lo que implica la necesidad de mejorar sus rendimientos, la calidad para fomentar su rápida multiplicación mediante el desarrollo y transformación de tecnologías (Colmenares y Giménez 2003).

Actualmente las variedades utilizadas no producen semillas en sus frutos (partenocárpicas), por lo cual se utilizan los cormos como el material de siembra (Canchignia y Ramos 2004). Comúnmente hay cinco métodos de propagación en plátano para el establecimiento de nuevo material de propagación. Estos son: vástagos verticales extraídos de campo; vástagos verticales reproducidos en parcelas de multiplicación de vástagos a campo; plantas de micro-cormos cultivados en viveros; plantas originadas de yemas secundarias producidas en cámara húmeda, camas de semilla y cultivadas en viveros; plantas producidas a partir de técnicas de cultivo de tejidos (FAO 2013).

La biotecnología ofrece nuevas oportunidades para la seguridad alimentaria, donde el plátano es fuente importante de alimento, fundamentalmente en países en vía de desarrollo (INIBAP 2004). La propagación *in vitro* es la técnica en la cual se extrae una pequeña parte de la planta (explantes) y se cultiva en condiciones asépticas en un medio de cultivo, formado por macronutrientes, micronutrientes, carbohidratos, vitaminas, reguladores de crecimiento y a veces aminoácidos, todo esto debe estar bajo ambiente controlado (Sandoval *et al.* 1991). Esta técnica comprende las etapas de iniciación o establecimiento, multiplicación, enraizamiento y endurecimiento (Rodríguez Burgos 2013).

La biotecnología clásica nace con el desarrollo y la aplicación del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para lograr obtener plantas libres de enfermedades sistémicas. En plátano generalmente se realiza con los meristemos apicales debido a que la velocidad de multiplicación de las células meristemáticas es mayor que la velocidad de translocación de los virus, dejando a la planta libre de ciertas enfermedades sistémicas (Ortega *et al.* 2010).

El cultivo de tejidos se realiza en condiciones controladas donde los cormos son reducidos y desinfectados o saneados para luego poder extraer el meristemo apical y a partir de este obtener hasta 1000 plántulas (FAO 2013). El saneamiento del material vegetal es sumamente importante ya que aquí se debe reducir las probabilidades de contaminación al mínimo. Actualmente existen tres tipos de terapias que son comúnmente utilizadas para obtener material vegetal libre de enfermedades, las cuales son: termoterapia, quimioterapia, y electroterapia (Ortega *et al.* 2010). La termoterapia consiste en introducir los explantes a tratamiento basado en la aplicación de calor seco o húmedo con variación de temperatura y duración según el tratamiento, especie de planta y patógeno a eliminar (Ruz *et al.* 2003). En general, en cuanto mayor es la temperatura y mayor es la duración de la exposición, mayor es la frecuencia de erradicación de los hongos, bacterias y virus (Wang *et al.* 2018).

El calor se aplica principalmente por agua, aire o vapor. Se puede tratar térmicamente una gran variedad de partes de plantas: árboles enteros, vástagos, vitroplantas, plántulas, tallos, esquejes, brotes, flores cortadas, semillas, bulbos, tubérculos, cormos o frutas y verduras almacenadas. Los microorganismos patógenos objetivo a eliminar son principalmente hongos y bacterias. Muchos estudios muestran el éxito de reducir las enfermedades por el calor. Sin embargo, el método requiere estudios para determinar el tipo de calor más apropiado para una parte de la planta en particular, y la combinación óptima de tiempo y temperatura de exposición a usar para la mejor eficiencia con el menor daño al tejido vegetal (Grondeau *et al.* 2011).

La quimioterapia consiste principalmente en el uso de antibióticos o cualquier otro químico dentro del medio de cultivo que inhiba la multiplicación de microorganismos en el tejido vegetal, esta es bastante cara por lo que no es común su aplicación. Electroterapia está basado en el uso de corrientes eléctricas que entran en contacto con las yemas durante un periodo variable de tiempo para lograr eliminar los patógenos presentes en el material vegetal, para su realización se necesita equipos especiales (Ortega *et al.* 2010).

En estudios previamente realizados se logró el establecimiento de *Musas* utilizando meristemas y la formación de brotes utilizando la citocinina BAP (6-Bencilaminopurina) a una concentración de 4 mg/L BAP en el medio de cultivo MS (Khaldun *et al.* 2007). Un estudio actual ha demostrado que BAP resulta ser más efectivo cuando es combinado con la auxina AIA (ácido indoleacético) para la optimización de brotes en diferentes variedades de la familia *Musa* (Davey y Sipe 2012).

Los objetivos de este estudio fueron:

- Evaluar el efecto de termoterapia en meristemas de plátano para el establecimiento *in vitro*.
- Evaluar el efecto de la 6- bencilaminopurina y el ácido indolacético en la producción de brotes en el establecimiento *in vitro* de meristemas de plátano.

2. MATERIALES Y METODOS

Ubicación.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria de la Escuela Agrícola Panamericana, ubicada en el Valle del Yeguaré a 30 km de Tegucigalpa, Honduras.

Medio de cultivo.

El medio de cultivo utilizado para llevar a cabo la investigación fue Murashige y Skoog (MS) modificado para el establecimiento *in vitro* de meristemas de plátano (Cuadro 1). El pH del medio se ajustó a 5.8 y se solidificó con Phytigel[®] 1.8 g/L. Se colocó aproximadamente 20 mL de medio de cultivo por frasco de 100 mL. El medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 1 kg/cm², 121 °C durante 20 minutos.

Cuadro 1. Medio de cultivo Murashige y Skoog modificado para establecimiento *in vitro* de meristemas de plátano cv. Curaré enano.

Componentes	Fórmula	Nombre común	mg/L
Macroelementos	NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio	1650.000
	KNO ₃	Nitrato de potasio	1900.000
	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado	370.000
	CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio bihidratado	440.000
Microelementos	KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio	170.000
	H ₃ BO ₃	Ácido bórico	6.200
	CoCl ₂ .6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado	0.025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado	0.025
	KI	Yoduro de potasio	0.830
	MnSO ₄ .4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado	22.300
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de sodio bihidratado	0.250
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado	8.600
	FeNa EDTA	Hierro Sodio Etilendiaminotetraacético	50.000
	Vitaminas		Inositol
		Tiamina	0.100
		Piridoxina	0.500
		Ácido Nicotínico	0.500
Reguladores	Citocinina	Bencialminopurina	3.000
	Auxina	Ácido Naftaleneacético	1.000
Carbohidratos		Sacarosa	30000.000

Fuente: Hoyos *et al.* 2008

Fuente de material vegetal.

Para la investigación se utilizó meristemas apicales extraídos de cormos de hijuelos de plátano, variedad Curaré enano, de 50 a 60 centímetros de altura, de aproximadamente 250 gramos provenientes de la plantación de la unidad de Ornamentales y Propagación (Figura 1).

A los cormos extraídos del campo se les eliminó parte del pseudotallo y las raíces, luego se lavaron con agua y jabón para proceder a la primera reducción de los explantes, que se realizó cortando el pseudotallo a una altura aproximada de 15 cm por encima de la inserción de la hoja en el corno basal y con un grosor basal aproximada de 5 cm y un peso aproximado de 100 g (Figura 1). Todas las herramientas usadas fueron desinfectadas con cloro líquido (4.72% ingrediente activo) antes de cortar cada corno.

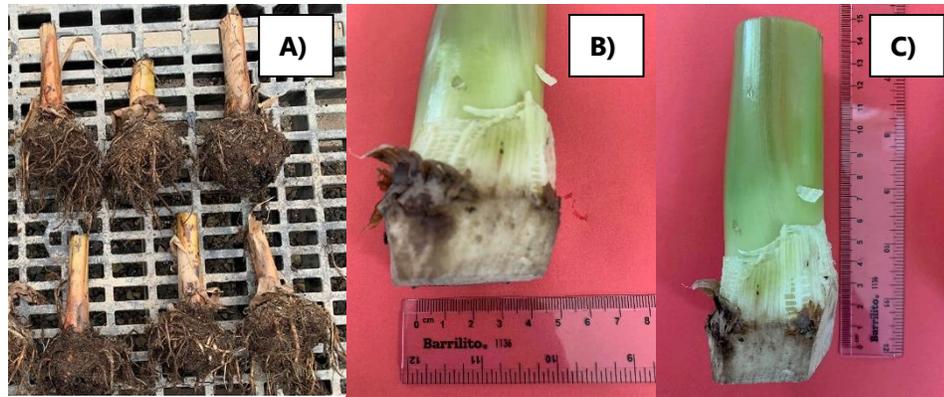


Figura 1. Cortes primarios y eliminación de las hojas apicales de la plántula de *Musa × paradisiaca* L. A) Plántula extraída de sustrato y un corte transversal eliminando hojas apicales. B) Corte del cormo basal eliminando raíces. C) Corte del pseudotallo reduciéndolo a una altura aproximada de 15 cm.

Preparación y desinfección de explantes.

Luego de realizar la primera reducción se ingresó los cormos al laboratorio para realizar una segunda reducción en la que se dejó a un tamaño aproximado de 8-10 cm de longitud y 3 cm de base (Figura 2). Todas las herramientas usadas fueron desinfectadas con cloro líquido (4.72% ingrediente activo) antes de cortar cada cormo los explantes reducidos se volvieron a lavar con agua y jabón. La desinfección se realizó sumergiendo los explantes en NaOCl al 30% (volumen/volumen) + 2 gotas de TweenTM80 por cada 100 mL de solución durante 15 minutos.



Figura 2. Cortes secundarios realizados en los cormos de *Musa paradisiaca* L para su segunda reducción dentro del laboratorio. A) Reducción de la longitud del pseudotallo a una altura aproximada de 8-10 cm. B) Cromo basal reducido a través de cortes transversales a un anchor aproximado de 3 cm.

Establecimiento de meristemos.

La extracción del meristemo apical se realizó reduciendo el tamaño hasta llegar a 0.5 cm de diámetro de la base (Figura 3). Este proceso se realizó en la cámara de flujo laminar. Previo a la siembra la cámara se desinfectó con alcohol al 70%, las herramientas se esterilizaron por 15 segundos a 250 °C en el esterilizador de calor seco Steri 250.

Una vez listos los meristemos se procedió a colocarlos en el medio de cultivo estéril. Luego fueron incubados a 22 °C con 60% de humedad relativa por tres semanas en condiciones de 16 horas fotoperiodo con luz blanca de 39 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{segundo}$. El medio de cultivo de cada explante fue refrescado cada 21 días a partir del día que fue sembrado.



Figura 3. Cortes y eliminación del pseudotallo de *Musa × paradisiaca L.* antes del establecimiento *in vitro*. A) Segunda reducción del explante dentro del laboratorio, B) Corte longitudinal de las hojas que cubren el pseudotallo dentro de la cámara de flujo laminar, C) Meristemo apical establecido *in vitro*.

Experimento 1: Efecto de alta temperatura en meristemos de plátano.

Se evaluaron dos métodos de termoterapia aplicado a los explantes los cuales fueron baño maría y horno (Figura 4). A continuación, se describen los tratamientos.



Figura 4. Tratamientos térmicos en el explante de la *Musa × paradisiaca L.* antes de la tercera reducción. A) Tratamiento térmico de calor controlado dentro de un horno incubador, B) Tratamiento térmico en baño maría controlado por el equipo calentador Isotemp.

Termoterapia con baño de maría.

Para estos tratamientos los cormos reducidos fueron sumergidos en agua destilada estéril a temperatura ambiente y colocados en un equipo para baño maría marca Isotemp® donde gradualmente la temperatura del agua donde estaban sumergidos los explantes subió hasta llegar a la deseada (Cuadro 2). Para cada tratamiento se repitió lo ya mencionado y cuando ya se alcanzaba la temperatura deseada se mantenía y se iniciaba con la toma de tiempo. Luego el beaker con los cormos reducidos se retiraba del Isotemp® para poder remover el agua caliente y agregarle agua a temperatura ambiente para enfriarlos y poder proceder con la desinfección y extracción del meristemo apical.

Cuadro 2. Tratamientos de termoterapia con baño maría previo al establecimiento *in vitro* de meristemas de plátano.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Minutos
0	Ambiente	0
1	55	10
2	55	15
3	35	10
4	33	15

Termoterapia con horno.

Para estos tratamientos los cormos reducidos se colocaron en una bandeja de aluminio donde se cubrieron con sustrato Pindstrup® y se colocaron en un horno incubador que se mantuvo a de 38 °C por 8 horas/día con una humedad relativa del 70% durante 5 o 7 días (Cuadro 3).

Luego de los tratamientos de termoterapia se procedió a la desinfección descrita anteriormente.

Cuadro 3. Tratamientos termoterapia en horno previo al establecimiento *in vitro* de meristemas de plátano.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Días	Humedad Relativa (%)
0	Ambiente	0	Ambiente
1	38	5	60
2	38	7	50

Variables a medidas.

Se evaluó el número de meristemas establecidos asépticos, porcentaje contaminados y muertos cada siete días por 21 días. Los cultivos contaminados fueron aislados diariamente del resto de cultivos.

Diseño Experimental.

Se usó un diseño completamente al azar (DCA). En el baño maría se realizó cinco tratamientos con 10 repeticiones por tratamiento, para un total de 50 repeticiones. En el horno incubador se realizó dos tratamientos con 20 repeticiones por tratamiento, para un total de 40 repeticiones.

Análisis Estadístico.

Se utilizó un análisis de varianza con separación de medias por el método Duncan ($P \leq 0.05$). Se usó el programa estadístico InfoStat versión 2018.

Experimento 2: Efecto de 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido indoleacético (AIA) en el establecimiento de meristemas de plátano cv. Curaré enano.

Preparación y desinfección de material vegetal. Los cormos fueron reducidos como se explicó anteriormente y a continuación fueron sumergidos en agua destilada estéril a temperatura ambiente y gradualmente la temperatura subió hasta llegar a 38 °C por cinco minutos usando el equipo para baño maría marca Isotemp®. Luego se procedió a la desinfección con NaOCL al 30% (v/v) + 2 gotas de Tween™80 por cada 100 mL de solución durante 15 minutos.

Tratamientos a evaluar. Para este experimento se usó los Macro, Micronutrientes, vitaminas, y carbohidratos del medio de cultivo MS descrito en el Cuadro 1, excepto por las hormonas indicadas en el cuadro que fueron reemplazadas por BAP y AIA según el tratamiento a evaluar (Cuadro 4). Cada 21 días se hizo refrescamiento de los medios de cultivo y limpieza de los explantes.

Cuadro 4. Dosis de 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido indoleacético (AIA) evaluados para el establecimiento *in vitro* de meristemas de plátano cv. Curaré enano.

Tratamiento	BAP mg/L	AIA mg/L
1	0	0.0
2	4	0.0
3	20	0.0
4	0	0.2
5	4	0.2
6	20	0.2

Variables medidas.

Se evaluó el número de estructuras que pueden ser posibles brotes por explante en los meristemas apicales ya establecidos. Esto se hizo a los 60 y 68 días después del establecimiento.

Diseño Experimental.

Se usó un diseño completamente al azar (DCA) con un arreglo factorial de 3×2 (tres dosis de BAP \times 2 dosis de AIA). Se realizaron seis tratamientos con 30 repeticiones por tratamiento, para un total de 180 unidades observacionales.

Análisis Estadístico. Se utilizó un análisis de varianza con separación de medias por el método Duncan ($P \leq 0.05$). Se usó el programa estadístico InfoStat versión 2018.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1: Efecto de alta temperatura en meristemas de plátano.

Termoterapia con baño de maría.

Durante las primeras tres semanas es cuando se observa el mayor porcentaje de contaminación, lo cual concuerda con los datos en el establecimiento de fresas dicho por Gómez y Cerdas (2003) donde se concluyó que al momento que van pasando los días después del establecimiento va ir incrementando el porcentaje de contaminación.

En la variable porcentaje de contaminación la termoterapia de 55 °C × 15 minutos presentó el mayor número de meristemas apicales contaminados (Cuadro 5). Grondeau *et al.* (2011) reporta que la termoterapia requiere estudios para determinar el tipo de calor más apropiado para un tejido vegetal en particular, y la combinación óptima de tiempo y temperatura de exposición a usar para mejorar la reducción de patógenos causantes de la contaminación *in vitro*.

Cuadro 5. Porcentaje de explantes contaminados de meristemas apicales de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) variedad Curaré enano en la etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a los tratamientos de termoterapia a través de la aplicación de calor húmedo utilizando el método baño maría.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	DÍAS		
			7	14	21
0	Ambiente	0	0 a [¥]	10 a	20 ab
1	55	10	0 a	10 a	10 a
2	55	15	20 b	50 b	50 b
3	35	10	0 a	0 a	10 a
4	33	15	0 a	0 a	0 a
Coeficiente de Variación			0.92	1.50	1.75
Probabilidad			0.0485	0.0038	0.0358
R ²			0.17	0.29	0.20

[¥] Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, según la prueba Duncan ($P \leq 0.05$).

Los tratamientos testigo, 55 °C 10 y 35 °C 10 o 15 minutos presentaron las mejores sobrevivencias (Cuadro 6), estos resultados concuerdan con Wang *et al.* (2018) donde reportaron un mayor nivel de sobrevivencia en brotes de pera *in vitro* que habían sido tratados térmicamente durante 50 días a una temperatura de 34 °C y brotes de manzana *in vitro* que habían sido tratados térmicamente durante 30 días a una temperatura de 38 °C. También dice que las variables temperatura y tiempo tienen una relación de mayor a menor, o viceversa, dependiendo del tipo de material vegetal a tratar. El tratamiento con 55 °C × 15 minutos presentó un 0% de sobrevivencia a la alta temperatura a mayor tiempo causando cocción de los explantes (Figura 5).

Cuadro 6. Porcentaje de explantes sobrevivientes de meristemos apicales de plátano (*Musa × paradisiaca* L.) variedad Curaré enano en la etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a los tratamientos de termoterapia utilizando el método baño maría.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	DÍAS		
			7	14	21
0	Ambiente	0	100 a [‡]	90 a	80 a
1	55	10	100 a	90 a	90 a
2	55	15	0 b	0 b	0 b
3	35	10	100 a	100 a	90 a
4	33	15	100 a	100 a	100 a
Coeficiente de Variación			0.69	0.94	1.30
Probabilidad			0.0397	0.0001	0.0001
R ²			0.28	0.80	0.66

[‡] Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, según la prueba DUNCAN (P ≤ 0.05).

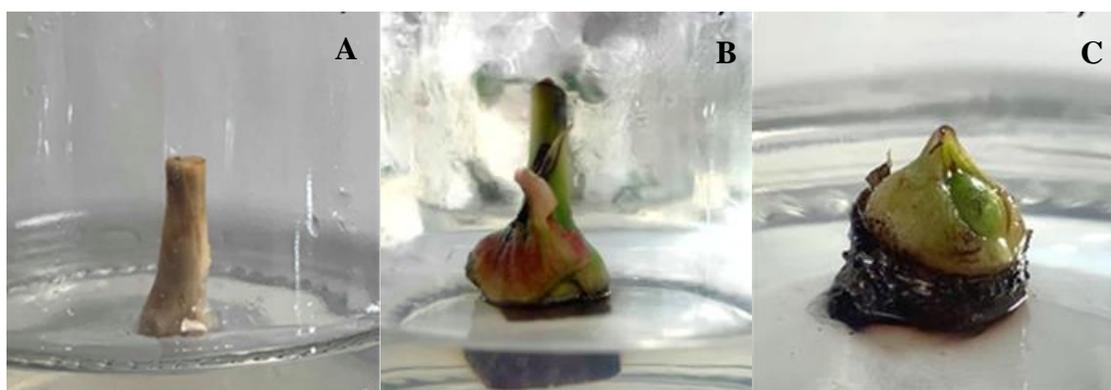


Figure 5. Explantes de plátano (*Musa × paradisiaca* L.) establecidos *in vitro* luego de tratamientos de termoterapia a través del método baño maría. Explantes muertos A) 55 °C x 15 minutos. Explantes vivos B) 33 °C x 15 minutos. C) 38 °C x 5 minutos.

Termoterapia con horno.

Álvarez *et al.* (2016), realizaron el tratamiento termoterapia a 18 °C por 20 días en ápices de papa en un horno incubador y reportaron un 100% de contaminación en los ápices de papa cultivados *in vitro*, siete días después del establecimiento en el medio MS. Si se compran estos resultados con los obtenidos en este estudio se puede observar que se obtuvieron relativamente los mismos resultados, ya que la introducción de calor seco a través del uso de un horno para mantener las condiciones de temperatura y humedad relativa sumamente iguales dentro del sustrato, donde se colocaron los cormos reducidos no logró eliminar los hongos y bacterias del tejido vegetal. A los 21 días después del establecimiento de los meristemas apicales resultaron con un total de 95% de contaminación, indicando que estadísticamente no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos, pero si son significativamente diferentes al tratamiento control, siendo este el mejor (Cuadros 7 y 8).

Cuadro 7. Porcentaje de explantes contaminados de meristemas apicales de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) variedad Curaré enano en la etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a los tratamientos de termoterapia a través de la aplicación de calor utilizando un horno incubador.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	DÍAS		
			7	14	21
0	Ambiente	0	0 b [‡]	10 b	20 b
1	38	5	30 b	80 a	90 a
2	38	7	80 a	100 a	100 a
Coeficiente de Variación			1.62	1.38	1.38
Probabilidad			0.0002	<0.0001	<0.0001
R ²			0.70	0.78	0.76

[‡] Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, según la prueba DUNCAN ($P \leq 0.05$).

Cuadro 8. Porcentaje de explantes sobrevivientes de meristemos apicales de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) variedad Curaré enano en la etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a los tratamientos de termoterapia a través de la aplicación de calor seco utilizando un horno incubador.

Tratamiento	Temperatura (°C)	Tiempo (días)	DÍAS		
			7	14	21
0	Ambiente	0	100 a [‡]	90 a [‡]	80 a [‡]
1	38	5	70 a	60 a	10 b
2	38	7	20 b	10 b	0 b
Coeficiente de Variación			1.60	1.61	1.40
Probabilidad			0.0002	0.0002	<0.0001
R ²			0.70	0.72	0.76

[‡] Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, según la prueba DUNCAN ($P \leq 0.05$).

Experimento 2: Efecto de 6-Bencilaminopurina (BAP) y Ácido indoleacético (AIA) en el establecimiento de meristemos de plátano cv. Curaré enano.

Se observó un 100% de fenolización en los meristemos apicales, lo cual no afectó la sobrevivencia de los explantes, pero fue necesario el refrescamiento de los medios de cultivo y limpieza de los explantes cada 21 días para eliminar los tejidos fenolizados. Los meristemos apicales presentaron un cambio de color de un color blanco-crema a un color verde al día 14, al día 60 del establecimiento los meristemos apicales presentaron formación de estructuras que podrían ser brotes.

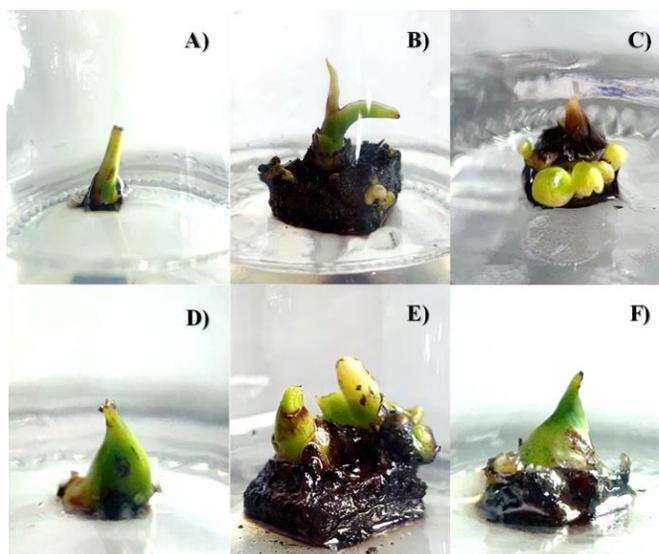


Figura 6. Brotes probables de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) establecidos *in vitro* en medio de cultivo MS. A) Medio sin fitohormonas. B) 4 mg/L BAP. C) 20 mg/L BAP. D) 0.2 mg/L AIA. E) 4 mg/L BAP + 0.2 mg/L AIA. F) 20 mg/L BAP + 0.2 mg/L AIA.

Al día 60 en la variable formación de brotes probables hubo efecto del BAP, AIA, y la interacción del BAP y AIA. Al día 68 en la variable formación de brotes probables no hubo efecto del AIA, pero sin embargo se mantuvo el efecto en la interacción y del BAP (Cuadro 9). En esta variable el mejor tratamiento fue el medio suplementado con 4 mg/L de BAP con una media de brotes probables de 2.75/explante, mientras que en los medios suplementados con AIA no hubo diferencia significativa (Cuadros 10 y 11). Khaldun *et al.* (2007) en su investigación con banano reportaron un promedio de brotes de 2.17/explante a los 30 días con una concentración de 4 mg/L BAP en medio MS.

Cuadro 9. ANOVA de número de brotes probables de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) variedad Curaré enano en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a las fitohormonas BAP y AIA.

Variables	Probabilidad	
	Día 60	Día 68
BAP	¥	¥
AIA	¥	n.s.
BAP×AIA	¥	¥

^{n.s.} No existe diferencia estadísticamente significativa según la prueba DUNCAN.

¥ Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, según la prueba DUNCAN ($P \leq 0.05$).

Cuadro 10. Número de brotes probables por meristemo apical de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) variedad Curaré enano en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a 6-Bencilaminopurina (BAP) suplementado en medio MS.

Tratamiento mg/L BAP	DÍAS	
	60	68
0	0.93 c [¥]	0.93 c
4	2.45 a	2.75 a
20	1.72 b	1.88 b
Probabilidad	<0.0001	<0.0001
Coefficiente de variación	4.61	4.87
R ²	0.32	0.34

¥ Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, según la prueba DUNCAN ($P \leq 0.05$).

Cuadro 11. Número de brotes probables por meristemo apical de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) variedad Curaré enano en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a Ácido indoleacético (AIA) suplementado en medio MS.

Tratamiento mg/L AIA	DÍAS	
	60	68
0.0	1.94 a [‡]	2.02 ^{n.s.}
0.2	1.46 b	1.69
Probabilidad	0.0047	0.0690
Coefficiente de Variación	4.61	4.87
R ²	0.32	0.34

^{n.s.} No existe diferencia estadísticamente significativa según la prueba DUNCAN.

[‡] Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, según la prueba DUNCAN ($P \leq 0.05$).

En el efecto en la interacción los tratamientos que presentaron un mayor número de brotes probables fueron: 4 mg/L de BAP, 4 mg/L de BAP + 0.2 mg/L de AIA, 20 mg/L de BAP. En la variable número de brotes probables el mejor tratamiento fue el suplementado con 4 mg/L de BAP + 0.2 mg/L de AIA con una media de brotes probables de 2.80 (Cuadro 12). Davey y Sipe (2012) en su investigación reportaron que, en banano, variedad Pisang Nangka, obtuvieron mayor número de brotes por meristemo apical con 5/0.2 y 6/0.2 mg/L BAP/AIA ambos con promedios de 5 brotes/explante. Ellos también lograron observar que los números de brotes decrecieron progresivamente cuando fueron establecidos en 8-14 mg/L BAP y 0.2 mg/L AIA. Dhed'a *et al.* (1991) reportaron que la combinación de BAP y AIA fueron efectivos en la propagación *in vitro* de plátanos y bananos los cuales generalmente demostraron un mayor número de brotes y un incremento de elongación de brotes significativamente mejor en la presencia de AIA y BAP que cuando se trataba solamente con BAP.

Cuadro 12. Número de brotes probables por meristemo apical de plátano (*Musa × paradisiaca L.*) variedad Curaré enano en etapa de establecimiento *in vitro* como respuesta a 6-Bencilaminopurina (BAP) × Ácido indoleacético (AIA) suplementado en diferentes concentraciones en el medio MS.

Tratamiento mg/L BAP × AIA		DÍAS	
		60	68
0	0.0	0.87 b [‡]	0.87 b
4	0.0	2.57 a	2.70 a
20	0.0	2.40 a	2.50 a
0	0.2	1.00 b	1.00 b
4	0.2	2.33 a	2.80 a
20	0.2	1.03 b	1.27 b
Probabilidad		0.0012	0.0027
Coeficiente de Variación		4.61	4.87
R ²		0.32	0.34

[‡] Los tratamientos con distintas letras son significativamente diferentes, según la prueba DUNCAN ($P \leq 0.05$).

4. CONCLUSIONES

- Se obtuvo un mayor número de meristemos apicales asépticos en los tratamientos termoterapia baño maría $55\text{ }^{\circ}\text{C} \times 10$ minutos, $35\text{ }^{\circ}\text{C} \times 10$ minutos y $33\text{ }^{\circ}\text{C} \times 15$ minutos.
- Los meristemos apicales presentaron un mayor número de brotes probables en el medio de cultivo suplementado con 4 mg/L de BAP con o sin 0.2 mg/L de AIA.

5. RECOMENDACIONES

- Evaluar temperaturas más altas por tiempos más cortos o intermitentes en baño maría para reducir la contaminación.
- Continuar con el desarrollo de los explantes *in vitro* hasta la etapa de aclimatación.

6. LITERATURA CITADA

- Álvarez S, López N, Tapia M, Leal A, y Guerrero A. 2016. Cultivos Tropicales: Hongos contaminantes en el establecimiento in vitro de ápices de papa. [consultado el 5 de sep. de 2019]. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362016000400007
- Canchignia F, Ramos L. 2004. Micropropagación de plátano variedad Barragante. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador.
- Colmenares M y Giménez C, (2003). Multiplicación in vitro Musa spp., mediante sistema de inmersión temporal. Revista Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. 20:468-477.
- Davey A, Sipe P. 2012. Effects of N6-benzylaminopurine and Indole Acetic Acid on In Vitro Shoot Multiplication, Nodule-like Meristem Proliferation and Plant Regeneration of Malaysian Bananas (Musa spp.). [consultado el 17 de sep. de 2019]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3799403/>
- Dhed'a D, Dumortier F, Panis B, Vuylsteke D, De Langhe E. 1991. Plant regeneration in cell suspension cultures of cooking banana 'Bluggoe' cultivar (Musa spp. ABB group). Fruits, 46: 125-135.
- FAO, Food and Agriculture Organization. 2013. Material de Propagación de calidad declarada. Estudio FAO Producción y Protección vegetal No 195. Roma (Italia). p. 17-19.
- Gómez A, Cerdas L. 2003. Revista de Biología Tropical. Establecimiento *in vitro* de *Cryptomeria japonica* (Taxodiaceae). [consultado el 4 de sep. de 2019]. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S003477442003000300008&script=sci_arttext
- Grondeau C, Samson R, Sands D. 2011. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. [consultado el 9 de sep. de 2019]. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689409701908>

- Hoyos J, Román C, Velasco R. 2008. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de fitohormonas en la micropropagación del plátano dominico hartón (*Musa* AAB Simmonds). [consultado el 9 de sep. de 2019]. <http://revistabioteecnologia.unicauca.edu.co/revista/index.php/bioteecnologia/article/viewFile/88/72>
- INIBAP. 2004. Los bananos vuelven a casa en Asia. INIBAP Annual Report. International Network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France. 66 p.
- Khaldun A, Haque M, Uddin M, Billah M. 2007. Effect of BAP and IAA on *in vitro* plantlet regeneration of local banana (*musa sp.*) cultivars. [Consultado el 15 de sep. de 2019]. file:///D:/OneDrive%20-%20Zamorano/Downloads/Banana_Khaldun.pdf
- Lardizábal R, Gutiérrez H. 2006. Manual de producción de plátano de alta densidad. USAID-RED. 38 p. [Consultado el 30 de julio de 2019]. <http://www.usaid-red.org/>
- Ortega N, Korvena S, Ruiz O, Santos E, Peralta E. 2010. Obtención de multimeristemas y callos de diferentes variedades de Banano y Platano *Musa acuminata* a partir de “Meristemas apicales” y “Scalps”. Revista Tecnológica ESPOL, Vol. 23, N° 1 Guayaquil (Ecuador). p. 4.
- Robinson J, Saúco V. 2012. Plátanos y Bananas. [consultado el 10 de julio de 2019]. https://books.google.co.in/books?hl=es&lr=&id=mAv3EQAcgZ8C&oi=fnd&pg=PA23&dq=cultivo+de+tejidos+platano&ots=7AuVquY_1&sig=aYxtld4j9icl02j0Z-3W7loNbrY#v=onepage&q&f=false
- Rodríguez Burgos PA. 2013. Cultivo de Tejidos. Módulo Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD. Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente. Contenido didáctico del curso Cultivo de Tejidos. Bogotá (Colombia). p. 34.
- Ruz L, Moranegra C, Montesinos E. 2003. Eficacia de la termoterapia en el control del fuego bacteriano (*Erwinia amylovora*) en material vegetal de propagación. [consultado el 3 de sep. de 2019]. <https://www.phytoma.com/la-revista/phytohemeroteca/147-marzo-2003/eficacia-de-la-termoterapia-en-el-control-del-fuego-bacteriano-erwinia-amylovora-en-material-vegetal-de-propagacin>
- Sandoval J, Brenes G, Pérez Sánchez L. 1991. Micropropagación de Plátano y Banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE. Serie técnica, Informe técnico CATIE N° 186. Turrialba (Costa Rica). p. 2.
- Wang M, Cui Z, Li J, Hao X, Zhao L, Wang Q. 2018. *In vitro* thermotherapy based methods for plant virus eradication. [consultado el 11 de sep. de 2019]. <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-018-0355-y>