



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FRUTICULTURA**

**ORGANOGENESIS DIRECTA DE *NOVO* EN *Musa AAA*  
'ENANO GIGANTE' Y 'FHIA 23'**

**ZEILA YANETH LOPEZ BARRIOS**

**T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO**

**2010**


La presente tesis titulada: **ORGANOGENESIS DIRECTA DE NOVO EN *Musa AAA*** 'ENANO GIGANTE' Y 'FHIA 23', realizada por la alumna **Zeila Yaneth López Barrios**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

## MAESTRA EN CIENCIAS

### RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD FRUTICULTURA

#### CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MA. ALEJANDRA GUTIERREZ ESPINOSA

ASESORA:

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESORA:

  
\_\_\_\_\_  
DRA. HILDA ARACELI ZAVALA MANCERA

Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Noviembre de 2010

## DEDICATORIA

**A DIOS:** Por haberme permitido estar con vida y dejarme llegar al final de esa meta (Gracias Señor).

**A MIS MADRES:** La señora Evangelina Barrios García y Elvia López Medina, con todo mi cariño, por su gran espíritu de lucha para hacer realidad un logro más en mi vida y estar conmigo en todos los momentos de mi vida. Gracias Mamás, dios las bendiga.

**A MIS PADRES:** Pascual Serafín Miranda, por haberme educado y guiado por el mejor camino de la vida, brindándome siempre su apoyo, como el mejor de los amigos hoy y siempre.

**A MIS HERMANOS:** Paloma Sarai, Ernesto Alonso López Barrios y Nelson Serafín, por haberme apoyado siempre, manteniendo entre todos, el espíritu de superación y hermandad.

**A MIS SOBRINOS:** Rodrigo Alonso, Joshua, Uriel, Lexlie, son personitas que quiero mucho y me alegran siempre.

**A MIS AMIGOS:** Alejandro Díaz Carrillo, Araceli Muñoz Ramírez, Verónica Santos Cárdenas, Martha Elba Ibarra Estrada.

## AGRADECIMIENTOS

**AL COLEGIO DE POSTGRADUADOS MONTECILLO:** Por permitirme desarrollarme dentro de sus instalaciones como Maestro en ciencias, para enfrentar al mundo como profesionista.

**AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA:** que me otorgo una beca económica para cursar mis estudios en el Colegio de Postgraduados y llevar a cabo la presente investigación.

**Al Fondo Mixto (CONACyT – Gobierno del Estado de Colima)** por el financiamiento otorgado al proyecto con clave COLIMA-2008-C01-83599; del cual los resultados de esta tesis forma parte del mismo.

**DRA. MA. ALEJANDRA GUTIERREZ ESPINOSA:** Le agradezco el tiempo, dirección, consejos y apoyo otorgado durante mi formación en el Colegio de Postgraduados. Como consejera.

**DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ:** Por su valioso apoyo y recomendaciones en el uso y efectos de bioreguladores.

**DRA. HILDA ARACELI ZA VALETA:** Por su conducción y paciencia en el desarrollo del estudio histológico.

**M.C. MARIA HILDA PEREZ BARRAZAZ:** Por su tiempo, dirección y apoyo durante mi formación de maestría del Colegio de Posgraduados y sobre todo el gran apoyo moral y paciencia en la realización de mi tesis.

**M.C. VICTOR VAZQUEZ VALDIVIA:** Por haber creído y confiado en mí, durante mi formación en el Colegio de Posgraduados, agradezco de todo corazón aquí y en el cielo que se, es el lugar donde se encuentra. Descanse en paz.

**DR JORGE VALDEZ:** Por permitirme tomar fotos de histología en su laboratorio.

**A LA SRA. ALEJANDRA HERRERA HERNANDEZ y SR. GUILLERMO ARELLANO HERNANDEZ:** Por su ayuda en el laboratorio y sobre todo por su amistad.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron a la realización de esta investigación.

# CONTENIDO

CAPITULO	
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
<b>I INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
1.1 Objetivos generales	14
1.2 Objetivos particulares	14
1.3 Hipótesis	15
<b>II REVISION DE LITERATURA</b>	<b>16</b>
2.1 Cultivo del banano ( <i>Musa sp</i> )	16
2.1. 2 Origen y distribución del banano	16
2.1. 3 Descripción botánica	16
2.1. 4 Clima y suelo para el cultivo de banano	17
2.1. 5 Propagación del banano	17
2.1. 6 Aspectos históricos de cultivo <i>in vitro</i>	18
2.1. 7 Totipotencia celular	22
2.1.8 Determinación y competencia	22
2.1.9 Morfogénesis <i>in vitro</i>	23
2.1.10 Embriogénesis somática	23
2.1.11 Organogénesis <i>in vitro</i>	24
2.1.12 Factores que afectan los procesos morfológicos	24
2.1.13 El genotipo	25
2.1.14 El explante	25
2.2 Ambiente químico: Medio de cultivo y sus componentes	26
2.2.1 Macronutrientes	27
2.2.2 Micronutrientes	27

2.2.3 Suplementos orgánicos (vitaminas y aminoácidos)	27
2.2.4 Fuente de carbono	28
2.2.5 Agentes gelificantes	28
2.2.6 Regulación hormonal de la morfogénesis <i>in vitro</i>	29
2.2.7 Auxinas	30
2.2.8 Citocininas	30
2.2.9 Giberelinas	32
2.2.10 Ácido abscísico	32
2.2.11 Nuevos reguladores del crecimiento vegetal	32
2.3 Ambiente físico	33
2.3.1 Temperatura	33
2.3.2 Humedad relativa	33
2.3.3 Luz	33
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> de banano	34
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
3.1 Material vegetal	35
3.2 Medios de cultivo	35
3.3 Condiciones de incubación	35
3.4 Ensayo I. Efecto de citocininas en la regeneración de brotes de banano cv. FHIA 23	36
3.5 Ensayo II. Efecto de citocininas en la regeneración de brotes del cv. Enano gigante	36
3.5.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico	36
3.6 Ensayo III. Efecto del tamaño del explante en la regeneración de brotes de los Cvs. FHIA 23 y Enano gigante	37
3.6.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico	37
3.7 Experimento I. Evaluación de citocininas en la regeneración de brotes de los cvs. Enano gigante y FHIA 23	38
3.7.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico	38
3.8 Análisis histológico de la diferenciación de brotes adventicios	38
3.8.1 Inclusión y parafina	39
3.8.2 Microtomía	39

3.8.3 Remoción de la parafina e hidratación del tejido	39
3.8.4 Tinción	39
<b>IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
4.1 Ensayo I. Evaluación de citocininas en <i>Musa</i> ‘FHIA 23’	41
4.2 Ensayo II. Evaluación de citocininas en banano ‘Enano gigante’	44
4.3 Ensayo III. Reducción del explante ‘Enano gigante’ y ‘FHIA 23’	47
4.4 Experimento I. Evaluación de cuatro citocininas ‘Enano gigante’ y ‘FHIA 23’	48
4.5 Análisis histológico de los brotes adventicios	51
<b>V CONCLUSIONES</b>	<b>60</b>
<b>VI RECOMENDACIONES</b>	<b>61</b>
<b>VII LITERATURA CITADA</b>	<b>62</b>
<b>VIII APÉNDICE</b>	<b>67</b>



## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número de raíces, hojas y brotes por explante y longitud de plantas obtenidos con tratamientos citocínicos en banano cv. FHIA 23.	42
Cuadro 2. Número de raíces, hojas y brotes por explante y longitud de plantas obtenidos con tratamientos citocínicos en banano cv. Enano gigante.	45
Cuadro 3. Número de raíces, hojas y brotes por explante y longitud de plantas obtenidos con tratamientos citocínicos en banano cv. FHIA 23.	49
Cuadro 4. Número de raíces, hojas y brotes por explante y longitud de plantas obtenidos con tratamientos citocínicos en banano cv. Enano gigante.	50

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reducción de explantes y siembra en medio solido	37
Figura 2. Desarrollo de raíces 'FHIA 23', diez tratamientos testigo, TDZ, 2ip, Zea, concentraciones (testigo 0, 0.5, 1 y 2 mg L <sup>-1</sup> )	43
Figura 3. Explante original y proliferación de brotes nuevos 'FHIA 23' (A) 'Enano gigante' (B). Barra = 5 mm	43
Figura 4. Explantes de Musa en frascos gerber con problemas de contaminación (A) y oxidación (B).	47
Figura 5. Diferencias morfológicas entre genotipos 'Enano gigante' y 'FHIA 23'	51
Figura 6. Puntos meristemáticos adventicios observados en cortes longitudinales de explantes del cultivar 'Enano gigante', crecidos en distintas citocininas y concentraciones	53
Figura 7. Cortes longitudinales de un explante de cv. 'Enano gigante' cultivado en presencia de 4 mg L <sup>-1</sup> de cinetina ad = puntos meristemáticos adventicios	54
Figura 8. Puntos meristemáticos adventicios observados en cortes longitudinales de explantes del cultivar 'FHIA 23', crecidos en distintas citocininas y concentraciones	55
Figura 9. Cortes longitudinales de un explante del cv. 'FHIA 23' cultivado en presencia de 4 mg L <sup>-1</sup> de cinetina ad = puntos meristemáticos adventicios	55

Figura 10. Puntos meristemáticos axilares observados en cortes longitudinales de explantes del cultivar 'Enano gigante', crecidos en distintas citocininas y concentraciones 56

Figura 11. Corte longitudinal de un explante del cultivar 'Enano gigante' cultivado en presencia de  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BA ax = puntos meristemáticos axilares

Figura 12. Puntos meristemáticos axilares observados en cortes longitudinales de explantes del cultivar FHIA 23, crecidos en distintas citocininas y concentraciones de las mismas. Test= testigo, 2ip=2-isopenteniladenina, zea=zeatina, BA=Bencilaminopurina, Kin=Kinetina. 58

Figura 13. Cortes longitudinales de un explante del cultivar 'FHIA 23' cultivado en presencia de  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BA ax = puntos meristemáticos axilares. Acercamiento de centro meristemáticos, parénquima con células lignificadas. 59

## RESUMEN

ORGANOGENESIS DIRECTA DE *NOVO Musa* AAA 'ENANO GIGANTE' Y 'FHIA 23'

ZEILA YANETH LÓPEZ BARRIOS

Colegio de Postgraduados, 2010

Nuestro país se encuentra entre las primeras 12 naciones productoras de banano (*Musa* sp), y en el ámbito nacional este cultivo ocupa el tercer lugar en importancia, además de estar incluido dentro del rubro de frutas de exportación, que lo convierte en un cultivo altamente rentable. El banano tiene gran demanda en el mercado nacional, con un consumo per cápita de 23 kg anuales, debido a que se encuentra disponible durante todo el año (Daquita, 2006). La Sigatoka negra (*Micosphaerella fijiensis*) es la principal enfermedad que limita la producción de este frutal. La transformación genética de genotipos es una técnica de vanguardia exitosa que puede permitir incorporar genes que confieran tolerancia a enfermedades por hongos, una vez que se disponga de un sistema de regeneración de plantas *in vitro*. Por lo anterior, en esta investigación se desarrolló un protocolo para la producción de plántulas *in vitro* de banano cv. Enano gigante y FHIA 23, vía organogénesis directa a partir de plantas completas, cormo y pseudotallo, regeneradas *in vitro*. Se llevaron a cabo tres ensayos y un experimento para evaluar el papel de diferentes citocininas: thidiazuron (TDZ), 6-furfurilaminopurina (cinetina) (Kin), zeatina (Zea), 6-bencilaminopurina (BA), 2- isopenteniladenina (2iP). Para conocer el efecto de estos reguladores de crecimiento, se evaluó el número de raíces, hojas y brotes regenerados en cada explante. Mediante un estudio histológico se identificó el origen de los brotes adventicios y axilares formados en los explantes cultivados en presencia de los distintos reguladores de crecimiento probados. El medio basado en las sales de Murashige y Skoog (1962) con 4 mg L<sup>-1</sup> de Kin, indujo el mayor número de brotes adventicios en los explantes, los cuales se formaron cerca de la base del explante. La formación de los brotes axilares fue promovida por BA a 4 mg L<sup>-1</sup>. De acuerdo a los resultados de la presente investigación es factible utilizar el protocolo desarrollado para incorporar a la planta de banano genes de resistencia a hongos mediante ingeniería genética.

Palabras clave: Organogénesis de *novo*, zeatina, cinetina, thidiazuron, micropropagación.

## ABSTRACT

Our country is among the top 12 nations producing banana (*Musa sp*), and at the national level this crop ranks third in importance, as well as being included within the category of fruits for export, which makes it a highly culture profitable. The banana is in high demand in the domestic market, consuming 23 kg per capita per year, because it is available throughout the year (Daquita, 2006). Sigatoka negra (*Micosphaerella fijiensis*) is the main disease limiting production of this fruit. Genetic transformation of genotypes is an advanced technique that can enable successful incorporating genes conferring tolerance to fungal diseases, once you have a plant regeneration system *in vitro*. Therefore in this research we developed a protocol for production of plantlets *in vitro* of banana cv. Giant Dwarf and FHIA 23, via direct organogenesis from complete plants, corm and pseudostem regenerated *in vitro*. It conducted three tests and an experiment to evaluate the role of different thidiazuron (TDZ), 6-furfurylaminopurine (kinetin) (Kin), zeatin (Zea), 6-benzylaminopurine (BA), 2-isopenteniadenine (2iP). To determine the effect of these growth regulators evaluated the number and percentage of roots, plants, leaves and shoots regenerated in each explant. By a histological study identified the origin of the axillary shoots and formed in the explants cultured in the presence of different growth regulators tested. The medium based on Murashige and Skoog (1962) with 4 mg L<sup>-1</sup> of Kin, induced the highest number of shoots in the explants, which formed near the base of the explant. The axillary bud formation was promoted by BA 4 mg L<sup>-1</sup>. According to the results of this research is feasible to use the protocol developed to incorporate the banana plant fungal resistance genes by genetic engineering.

Key words: Organogénesis de *novo*, zeatin, kinetin, thidiazuron, micropropagation.

## I. INTRODUCCIÓN

La producción frutícola en México genera muchos empleos en el manejo de las huertas y durante la cosecha. El banano (*Musa sp*) es importante como fuente de alimento a nivel nacional ya que se ha adaptado a las distintas condiciones climáticas de los estados productores: Chiapas (21,900 ha), Veracruz (14,200 ha), Tabasco (12,900 ha), Nayarit (6,500 ha), Michoacán (4,700 ha), Colima (4,200 ha), Oaxaca (3,900 ha), Guerrero (2,500 ha) y Jalisco (1,800 ha) (Robles, 1993). Asimismo, la producción de banano es rentable debido a su alto rendimiento y comercialización en el mercado nacional e internacional.

El banano pertenece a la familia de las Musáceas y al género *Musa*, existen dos especies comestibles, *Musa Cavendishii*, que son los bananos para consumo en fresco y *Musa paradisiaca*, plátanos para cocción (Manzur, 2001).

La producción y calidad del fruto de este cultivo se han visto afectadas principalmente por plagas y enfermedades, las cuales ocasionan rendimientos bajos y mala calidad del producto. La Sigatoka negra causada por un hongo *Micosphaerella fijiensis*, es considerada como la enfermedad más destructiva del banano (Daquita, 2006). Para contrarrestar los daños ocasionados por este patógeno, se ha recurrido al control químico y al mejoramiento genético convencional con el objetivo de producir materiales tolerantes o resistentes al hongo (Daquita, 2006).

La producción de plátano con un manejo integrado plagas y enfermedades es de  $20 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$ , con posibilidad de obtener más de  $50 \text{ t}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$  en promedio (SAGARPA 2002). Sin embargo, debido a que la propagación tradicional del banano se lleva a cabo mediante cormos o hijuelos, es frecuente la transmisión de plagas y enfermedades de un lugar a otro. Lo anterior, se debe a que no existen huertos y viveros destinados exclusivamente a la producción de propágulos “semilla” en los que se controle la sanidad de los mismos. Asimismo, este método de reproducción tiene la desventaja de que la tasa de multiplicación es muy reducida y requiere de espacios grandes (Orozco, 1993).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han jugado un papel importante en la producción y mejoramiento de cultivos frutícolas, la micropropagación ha sido ampliamente utilizada para propagación a gran escala de distintas especies, ya que no sólo permite la obtención de miles de individuos a partir de un genotipo «élite» seleccionado, la propagación de especies en peligro de extinción, la producción de plantas libre de virus, sino también la incorporación de genes que confieran resistencia a patógenos como los hongos, mediante ingeniería genética (Debergh y Maene, 1981; Thorpe y Harry, 1997).

Con estos antecedentes, en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

### **1.1 Objetivo general:**

- Desarrollar un sistema de regeneración *in vitro* vía organogénesis directa de banano cv. Enano gigante y FHIA 23.
- Analizar histológicamente el origen adventicio o axilar de los brotes generados.

### **1.2 Objetivos particulares:**

- Definir el efecto de los bioreguladores, 2-isopenteniladenina, zeatina, thidiazuron, bencilaminopurina, cinetina, en la organogénesis *de novo* (adventicia) en pseudotallos de banano.
- Determinar la capacidad morfogenética de los cultivares ('Enano gigante' y 'FHIA 23') de banano'.
- Identificar el origen anatómico de los brotes axilares y adventicios en los dos cultivares.
- Determinar las zonas de crecimiento útiles para la transformación genética.

### **1.3 Hipótesis:**

- La respuesta morfogénica de banano depende de las concentraciones y combinaciones de bioreguladores.
- Los brotes adventicios y axilares tienen un origen histológico distinto.
- La capacidad morfogénica será diferente en el cultivar 'Enano gigante' y 'FHIA 23.



## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 El cultivo del banano (*Musa sp*)

Uno de los cultivos más importantes en la agricultura es el banano, (*Musa sp.*); el cual puede encontrarse en estado silvestre, semisilvestre ó cultivado. Como cultivo tropical se le reconoce como el más difundido del mundo por su importancia alimenticia y su gran impacto económico y cultural, especialmente en países en desarrollo, ocupando uno de los primeros lugares de las frutas tropicales (Ortiz *et al.*, 2000).

#### 2.1.2. Origen y distribución del banano

El banano ha estado presente en diversas culturas y civilizaciones humanas durante miles de años; se le considera una de las primeras frutas cultivadas por agricultores primitivos. Se presume que el centro de origen del banano se encuentra en Asia meridional y que en esta región ocurrió su domesticación (Ortiz *et al.*, 2000).

#### 2.1.3 Descripción botánica

El banano pertenece a la familia de la familia de las Musáceas y al género *Musa*; existen dos especies comestibles, *Musa cavendishii*, (para consumo en fresco) y *Musa paradisiaca*, (para cocción).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Subclase: Liliopsida

Orden: Zingiberales

Familia: Musaceas

Género: *Musa*

Especie: *Musa paradisiaca* (para cocción) y *Musa cavendishii* (para consumo en fresco).

#### **2.1.4 Clima y suelo para el cultivo del banano**

El cultivo requiere un clima cálido y humedad constante en el aire. Necesita una temperatura media de 26-27 °C con lluvias prolongadas y distribuidas en el año; son preferibles las llanuras húmedas próximas al mar, resguardadas de los vientos y regables (Daquita, 2000). El crecimiento de la planta se detiene en temperaturas inferiores a los 18 °C y se producen daños en temperaturas menores de los 13 °C y mayores a los 45 °C (Daquita, 2000). En la cuenca del mediterráneo es posible su cultivo, aunque no para producir frutas selectas, en las localidades donde la temperatura media anual oscila entre los 14 y 20 °C y donde las temperaturas invernales no descienden por debajo de 2 °C (Manzur, 2001).

En condiciones tropicales, la luz, no tiene tanto efecto en el desarrollo de la planta como en condiciones subtropicales, aunque al disminuir la intensidad de luz, el ciclo vegetativo se alarga. El desarrollo de los hijuelos también está influenciado por la luz en cantidad e intensidad (Manzur, 2001). Los efectos del viento pueden variar, desde provocar una transpiración anormal debida a la reapertura de estomas foliares, siendo el daño más generalizado, provocando unas pérdidas en el rendimiento de hasta un 20 %. Los vientos muy fuertes rompen los pecíolos foliares, quiebran los pseudotallos y en ocasiones arrancan las plantas enteras (INFOAGRO, 2005).

Este cultivo es poco exigente en cuanto a suelo, ya que prospera igualmente en terrenos arcillosos, calizos o silíceos siempre que sean fértiles, permeables, profundos, ricos y bien drenados, especialmente en materias nitrogenadas; pero prefiere, los suelos ricos en potasio, a los obtenidos por la roturación de los bosques, susceptibles de riego de verano, pero sin agua en invierno. La platanera tiene una gran tolerancia a la acidez (4.5 – 8.0 pH) del suelo (INFOAGRO, 2005).

#### **2.1.5 Propagación del banano**

La propagación del banano tradicional ha sido mediante la utilización de cormos o hijuelos, estos métodos favorecen la transmisión de plagas y enfermedades de plantaciones en producción ya contaminadas de donde provienen;

ya que no existen huertos y viveros destinados exclusivamente a la producción de plantas. Además, este método de reproducción tiene la desventaja de que la tasa de multiplicación es muy reducida y requiere suficiente espacio (Orozco, 1993).

Recientemente se ha recurrido a la técnica de cultivo de tejidos ó micropropagación *in vitro*, biotecnología que puede ser utilizada para la reproducción masiva el banano; esta técnica presenta la ventaja sobre otros métodos de propagación, de que pueden obtenerse cientos de plantas a partir de un ápice, Además requiere poco espacio, las plantas producidas son uniformes y son plantas libres de plagas y enfermedades (Robles, 1993).

#### **2.1.6. Aspectos históricos generales del cultivo *in vitro***

El término de cultivo de tejidos vegetales denota genéricamente todo cultivo de células, tejidos, o parte de la planta (Murashige, 1979). Este consiste en extraer pequeños fragmentos de tejidos jóvenes de la planta, desinfectarlos y promover su crecimiento en un medio artificial estéril dentro de una cámara de cultivo con ambiente controlado (luz, temperatura, fotoperiodo). Esta técnica biotecnología se ha convertido en una poderosa herramienta para la propagación y mejoramiento de muchas especies vegetales (Thorpe, 2000). Mediante la propagación por cultivo de tejidos o micro-propagación es posible cultivar cualquier parte de la planta y durante su desarrollo se puede mantener o dirigir su crecimiento y diferenciación para la formación de callo, brotes, raíces, embriones (Thorpe, 2000).

Existen diversos tipos de cultivos *in vitro* dependiendo de los objetivos perseguidos; dentro de ellos se pueden mencionar el cultivo de células, tejidos y órganos vegetales que se asocia a las investigaciones de micropropagación, éste consiste en cultivar en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo (Mígueles, 2001).

Las técnicas de cultivos de tejidos vegetales *in vitro* han jugado un papel importante en la producción y mejoramiento de cultivos frutícolas, hortícolas y su aplicación en la agricultura, es paralela al desarrollo de las técnicas mismas. Este

papel se ve reflejado en la producción de plantas libres de patógenos, almacenamiento de germoplasma, micropropagación y modificación vegetal (Debergh y Maene, 1981; Thorpe, 2007).

Los primeros intentos en esta técnica fueron realizados por Murashige y Skoog (1962) quienes observaron que los principales nutrimentos de las plantas superiores eran sustancias inorgánicas, y prepararon una solución nutritiva, la cual ha sido utilizada por muchos investigadores desde entonces.

Sin embargo, se acepta que los primeros antecedentes reales del cultivo de tejidos vegetales se debieron (Street, 1977), quien realizó un intento de cultivo de células aisladas de tres géneros de monocotiledoneas: *Erithronium*, *Orthogalum* y *Tradescantia*, sin tener éxito, ya que no observó división celular.

Steward *et al.* (1952), dieron a conocer el efecto tan pronunciado que ejerce el agua de coco. Endospermo de la semilla de coco (*Cocos nucifera* L.) en el crecimiento de células aisladas de raíces de zanahoria (*Daucus carota*). Los mismos autores, también con el uso del endospermo de coco, demostraron y confirmaron la totipotencialidad de las células somáticas vegetales así como la presencia de hormonas vegetales en este medio de cultivo.

Murashige y Skoog (1962) publicaron un trabajo clásico donde se dieron a conocer un medio definido para el cultivo *in vitro* de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), el cual posteriormente ha sido el más citado en la literatura sobre este tema y que ha sido la base para el cultivo varios cultivares de banano como Enano gigante, FHIA 5 y Dominico.

Narayanaswamy (1977) analizó los resultados de dos investigaciones de cultivo de tejidos para llegar a las siguientes consideraciones: 1) la superficie del inoculo es importante en la determinación del potencial de regeneración. 2) la edad fisiológica es un factor importante y ejerce influencia en la formación de órganos.

Lakshmi *et al.* (1982) se refiere al cultivo de tejidos vegetales en el mejoramiento de árboles de importancia económica. Ellos realizaron un estudio en

el sándalo (*Santalum álbum*), en el que indujeron la embriogénesis somática de cultivo de callos para posteriormente inducir la formación de embriones. La técnica fue usada con éxito en la propagación de variedades seleccionadas.

Navarro y Vera (1987) usaron como inoculo hojas de *Echeverría elegans* para demostrar que la edad fisiológica del inoculo es un factor importante que ejerce influencia en la organogénesis; de este trabajo se concluyó que las hojas jóvenes solo forman raíces y las maduras solo yemas vegetativas.

Nuevamente Navarro y Vera (1987), partiendo de la idea de obtener condiciones alimenticias semejantes al floema, cultivaron ápices radiculares de chícharo (*Pisum sativum*) y maíz (*Zea maíz*) en un medio enriquecido con sales inorgánicas, glucosa, peptona, asparagina y varios aminoácidos.

También, Navarro y Vera (1987), son reconocidos como los primeros investigadores que lograron obtener plantas libres de virus en dalia (*Dahlia pompón*) a partir de meristemas del tallo.

García y Bermúdez (2000) dieron a conocer el efecto tan pronunciado que ejercen las auxinas en la inducción de mutaciones no favorables gamma en el cultivo *in vitro* de brotes del cultivar Gran enano (AAB). Lo cual no fueron tan favorecidos.

Se observó la capacidad del regulador de crecimiento vegetal Bap para iniciar la división celular. Posteriormente usaron combinaciones de auxinas para estudiar la formación de brotes y raíces en cultivos de callo en tabaco (*Nicotiana tabacum*) y propusieron la hipótesis de que el desarrollo organizado ocurre como resultado de las interacciones cuantitativas entre reguladores de crecimiento, especialmente auxinas y citocininas, entre estos y otros factores.

Para eventos de transformación genética con *Agrobacterium tumefaciens*, y *A. rhizógenes*, la principal ruta de regeneración ha sido la organogénesis directa a partir de plantas *in vitro*; aún cuando se ha visto que es posible la regeneración indirecta de órganos a partir de material vegetal maduro, donde se obtiene una tasa

de regeneración de 60 a 86 nuevas plantas donadora de explantes (Moreira-Díaz *et al.*, 2000).

Caboni *et al.* (2001) reportan, los beneficios potenciales del uso del cultivo de ápices de pera con el uso de citocininas en el proceso morfogénico demostraron eficazmente regeneración de brotes adventicios.

Orellana y García (2002) publicaron un trabajo clásico donde dieron a conocer un manejo de hijos y ápices de cultivares de (*musa sp*) para iniciar la micropropagación y comportamiento durante seis subcultivos *in vitro*, el cual ha sido el más citado en la literatura sobre este tema y que ha servido para el cultivo de un amplio número de especies como son: Enano gigante y Dominico.

Montero *et al.*, (2006) desarrollaron un protocolo a través de los procedimientos de la biotecnología para contar con un protocolo eficiente y fiable para la regeneración *in vitro* y organogénesis directa y múltiple e tejidos juveniles de guandú o gandul (*Cajanus cajan*). Logrando inducir la formación múltiple de vástagos enraizados, generando plantas vigorosas.

Ali y Hasnain (2006) lograron brotación adventicia en los internodales de explantes de *Brassica oleracea* y observaron la eficiencia de la inducción adventicia en los explantes fuertes y vigorosos.

Esta técnica puede ser dirigida para producir plantas idénticas (clones) o bien para inducir variabilidad. Se han usado secciones de hojas, tallo y meristemas como explantes también pueden ser usados, órganos completos como anteras, óvulos, embriones y en muchas ocasiones pueden usarse células y protoplastos aislados Robles (1996).

Mogollón de Lucena y Gil de Serpa (1992) llevaron a cabo un estudio histológico de la formación de órganos *in vitro* de *Mussaenda erythophylla* "Rocea" para determinar el origen de los brotes en normales y adventicios, concluyendo que estos se formaban en áreas meristematicas originadas por diferenciación del tejido localizado en la base de la planta.

### **2.1.7. Totipotencia celular**

Schwann y Schleiden (1838) formularon la “Teoría de la totipotencia” definido como el potencial o capacidad inherente de una célula vegetal somática para desarrollarse en una planta completa si se estimula adecuadamente. La totipotencia implica que toda la información genética necesaria para el crecimiento y reproducción del organismo está contenida en la célula; aunque en teoría todas las células son totipotentes, las células meristemáticas son las más capaces para expresarla (Razdan, 2003).

Esta totipotencia es una de las principales propiedades de las células vegetales, que aseguran la posibilidad de sobrevivencia de las plantas bajo diferentes condiciones ambientales. La totipotencia de las células vegetales garantiza un amplio uso de la biotecnología. En condiciones *in vitro*, prácticamente cualquier célula viva, puede, después del período de diferenciación y bajo la influencia de promotores de crecimiento y diferenciación un medio de cultivo adecuado puede iniciar la proliferación casi infinita en la forma de callos o cultivos en suspensión, iniciar la formación de brotes o raíces, o embriogénesis somática. Estudios recientes han logrado detectar que los genes que controlan el desarrollo vegetal *in vivo* juegan un papel principal en la expresión de la *totipotencia* de las células vegetales *in vitro* (Ezhova, 2003).

### **2.1.8. Determinación y Competencia**

En el desarrollo de los organismos, las células llegan a estar progresivamente comprometidas a destinos específicos. Este proceso llamado determinación involucra cambios fenotípicos estables que persisten en la ausencia del estímulo que lo inició. (Ezhova, 2003).

La competencia es el potencial endógeno de una célula o tejido para recibir y responder a una señal del desarrollo. Esta competencia es vista como un estado fisiológico, celular o molecular de disposición para los siguientes pasos de la vía morfogénica particular. Al inicio las células no son competentes para responder a

los estímulos pero adquieren esta competencia durante una fase inicial de desdiferenciación (Carman, 1990. *Ezhova, 2003*).

### **2.1.9. Morfogénesis *in vitro***

Una de las cuestiones más elementales en la regeneración a partir de células somáticas es el entendimiento y esclarecimiento de los mecanismos que controlan los eventos del desarrollo. La morfogénesis vegetal *in vivo* e *in vitro*, es un proceso del desarrollo complejo y se define como un cambio fisiológico y/o morfológico que permite la especialización de una célula, tejido, órgano o planta entera durante su desarrollo; la morfogénesis incluye el desarrollo de células que difieren de la célula madre y la diferenciación y arreglo de estas células en un orden definido es el resultado de la división celular de acuerdo a un plan y secuencia específicos. La organogénesis y embriogénesis somática son las dos vías por las que ocurre la morfogénesis *in vitro*, mediante la cual se da la regeneración de plantas superiores (Litz, 1993).

### **2.1.10. Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática se define como el proceso por el cual células somáticas haploides o diploides se desarrollan en plantas diferenciadas pasando por las etapas características embriológicas sin que exista la fusión de gametos (Litz, 1993). En muchas plantas, particularmente de familias cuyas especies son predominantemente tropicales, las nucelas tienen la capacidad de producir embriones adventicios; la producción de embriones somáticos se puede estimular *in vitro* en éstas y en otras especies, cuya nucelas no es normalmente embriogénica.

Por embriogénesis somática, originada directamente en explantes de nucelas o de callos, se han regenerado cultivares poliembriónicos y monoembriónicos de *Citrus* y de mango (*Mangifera indica*) y especies monoembriónicas de manzana (*Malus domestica*), *Ribes rubrum* y *Vitis vinífera* (Zatyko *et al.*, 1975; Mullins *et al.*, 1976; Eichholtz *et al.*, 1979; Rangan *et al.*, 1982; Litz *et al.*, 1984).



### **2.1.11. Organogénesis *in vitro***

La organogénesis *in vitro* puede suceder directamente de yemas axilares preexistentes o bien de *novo* dando lugar a la formación de estructuras adventicias (brotes o raíces) a partir de tejido ya diferenciado no meristemático. La obtención de estos brotes puede ser de manera directa o indirecta. En la primera se pueden formar brotes en el explante, sin la formación de callo. La segunda se refiere a la inducción de callos a partir de los cuales se forman brotes y raíces. La organogénesis *in vitro* ha sido ampliamente usada en la biotecnología vegetal tanto para la micropropagación, transformación genética y estudios del desarrollo vegetal (Zhang y Lemaux, 2004).

La organogénesis *in vitro* depende de la aplicación exógena de hormonas, en particular auxinas y citocininas y también de la habilidad del tejido para responder a los estímulos hormonales durante el cultivo (Zhang y Lemaux, 2004). La mayor proporción auxina-citocinina en el medio, normalmente induce la formación de raíces mientras que una proporción menor de auxina-citocinina promueve la formación de brotes.

En general, se reconocen tres fases para que se lleve a cabo la organogénesis; en la primera, las células del explante adquieren la competencia. En la segunda, las células competentes son canalizadas y determinadas para la formación de un órgano específico bajo la influencia de hormonas vegetales, y en la tercera, la morfogénesis continúa independientemente del suministro de fitohormonas (Sugiyama, 2000).

### **2.1.12. Factores que afectan los procesos morfogénicos**

Para optimizar la frecuencia y calidad de la embriogénesis somática así como la inducción de la organogénesis, es necesario considerar factores internos y externos. Los internos incluyen el genotipo, el estado de desarrollo de la planta donadora y el tipo de explante. Los extrínsecos comprenden el entorno del cultivo, el suministro de nutrimentos orgánicos e inorgánicos, fitohormonas y las condiciones

físicas (pH, humedad, luz, temperatura y potencial osmótico) (Ramage y Williams, 2002).

### **2.1.13 El genotipo**

El factor que más influye en la morfogénesis *in vitro* es el genotipo, puesto que el material vegetal tiene la habilidad genética para producir la respuesta deseada. Algunas especies o cultivares regeneran brotes o producen embriones somáticos con una estimulación exógena relativamente pequeña, mientras que otras son más difíciles para promover un estímulo morfogénico. Incluso, dentro de la misma especie existen notables diferencias entre subespecies y cultivares, por lo que la formulación de un simple medio de cultivo que es adecuada para un cultivar, frecuentemente es inadecuada para la estimulación de la morfogénesis en otro cultivar. Así hay especies de ciertas familias que son particularmente difíciles de regenerar ya sea por vía embriogénica u organogénica (Ramage y Williams, 2002).

### **2.1.14 El explante**

El tipo de explante, tamaño, edad y procedencia de la planta pueden afectar el inicio satisfactorio de los cultivos o la inducción de la morfogénesis *in vitro*. Se deben utilizar explantes provenientes de plantas cultivadas en invernadero bajo buenas condiciones de sanidad y nutrición, para reducir la frecuencia de contaminación. También se recomienda evitar el uso de explantes de raíces y rizomas que proceden de plantas crecidas en el campo debido a que su establecimiento en condiciones asépticas dificulta su crecimiento y desarrollo (Salazar y Surga, 1988; Taji *et al.*, 2002).

La edad fisiológica del explante es de gran influencia en la morfogénesis, por ello cuanto más joven e indiferenciado sea éste, mejor será su respuesta *in vitro*. En consecuencia, los meristemos apicales y axilares se usan ampliamente en numerosas especies. (Salazar y Surga, 1988; Taji *et al.*, 2002).

Respecto al tamaño del explante, cuanto más grande sea éste, mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa

de órganos; sin embargo, también aumentan las probabilidades de contaminación por microorganismos. Es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del objetivo que se persiga, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios de cultivo complejos (Salazar y Sarga, 1988; Taji *et al.*, 2002).

La época del año es un factor que suele tener efecto en la micropropagación y que generalmente se asocia con el grado de dormancia que presenta ciertos explantes y la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos (Molina *et al.*, 2002).

## **2.2 Ambiente químico: Medio de cultivo y sus componentes**

El éxito del cultivo de tejidos depende, en gran medida, del medio de cultivo utilizado. El medio de cultivo no solo debe proveer macro y micronutrientes, sino también una fuente de carbohidratos, normalmente sacarosa, para remplazar el carbón que las plantas fijan de la atmósfera por la fotosíntesis. Los mejores resultados se obtienen adicionando algunos compuestos orgánicos (vitaminas, aminoácidos, etc.) y fitohormonas (Williams, 1993).

Murashige (1962), estableció que los principales componentes de un medio de cultivo pueden agruparse en: (1) sales inorgánicas. (2) sustancias orgánicas, (3) compuestos no definidos de origen natural, y (4) materiales inertes de soporte. Por su parte, Gamborg (2002) consideraron que los ingredientes de un medio nutritivo comprende 5 grupos: nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, vitaminas, reguladores de crecimiento y suplementos orgánicos.

Varios son las variables que determinan el éxito del establecimiento de un cultivo *in vitro*. Entre las variables puede mencionarse: la importancia del establecimiento de un cultivo estéril, la concentración y balance de los reguladores vegetales usados (auxinas-citocininas) balance que permite “dirigir” en cierta medida diferentes respuestas morfológicas y el desarrollo del tejido (Robles, 1996).

### **2.2.1 Macronutrientos**

Los macronutrientos (N, P, K, Ca, Mg, y S) proveen los elementos más indispensables para el desarrollo de las plantas y constituyen al menos el 0.1 % del peso de materia seca de las plantas. El paso más importante en el manejo de un medio de cultivo es la selección de estos iones su concentración y balance (George y Sherrington, 1984).

Comúnmente el N se suministra como una mezcla de iones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e iones amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). En forma de iones de amonio éste se puede incorporar directamente a las macromoléculas, mientras que los nitratos deben ser reducidos antes de su incorporación. En concentraciones elevadas, los iones amonio pueden ser tóxicos y ocasionar la acidificación del medio, además de causar problemas de vitrificación. Por otra parte, el fósforo normalmente se suministra como ión fosfato y altas concentraciones pueden producir la precipitación de elementos en fosfatos insolubles (Gamborg, 2002).

### **2.2.2 Micronutrientos**

Los elementos hierro, magnesio, zinc, cobre, molibdeno, yodo, boro, cobalto y níquel son requeridos en pequeñas cantidades para el desarrollo de las plantas y actúan como cofactores e inductores de la síntesis de enzimas. El hierro se agrega al medio de cultivo como sulfatos de hierro, combinado con el ácido etilendiaminotetracético (EDTA). El complejo EDTA-Fe permite la liberación lenta y continua de este elemento en el medio, sin este complejo de hierro puede precipitarse en el medio como óxido férrico (Gamborg, 2002).

### **2.2.3 Suplementos orgánicos (vitaminas y aminoácidos)**

Las vitaminas son sustancias requeridas por las células vegetales para realizar papeles catalíticos en el metabolismo. De manera natural, las plantas son capaces de sintetizar sus propios requerimientos, pero bajo cultivo *in vitro* no necesariamente ocurre así (George y Sherrington, 1984). Generalmente, la calidad de vitaminas sintetizadas, incluso en tejidos y células fotosintéticamente activos, es

insuficiente para asegurar el suministro. Por lo tanto, al menos las vitaminas del grupo B como tiamina, piridoxina y ácido pantoténico, pero también, biotina y mio-inositol, deben adicionarse al medio de cultivo (Razdan, 2003).

El ácido ascórbico (Vitamina C) es benéfico en algunos casos, debido probablemente a su capacidad para actuar como un agente reductor y para retrasar la formación de compuestos fenólicos, que inhiben el crecimiento (Stasolla *et al.*, 2006).

Los aminoácidos proveen a las células vegetales una fuente de N disponible rápidamente y su absorción también puede ser más rápida que el N inorgánico en el mismo medio. Al parecer no todos los aminoácidos son importantes para el desarrollo *in vitro* y los requerimientos varían de acuerdo al tejido u órgano. El aminoácido más utilizado es la glicina pero su inclusión no es esencial. La caseína hidrolizada se puede emplear como una fuente económica de una mezcla de aminoácidos. También en algunos casos se puede utilizar arginina, aspargina, ácido aspártico, alanina, ácido glutámico y prolina (Gamborg, 2002).

#### **2.2.4 Fuente de carbono**

La fuente de carbono es un componente importante en cualquier medio de cultivo y es esencial para el desarrollo *in vitro*, ya que las condiciones de cultivo son poco apropiadas para la fotosíntesis. La sacarosa, como fuente de carbono, es fácilmente asimilable por las plantas, ya que se transporta de manera natural, y es relativamente estable además de ser económica, por lo tanto, es la más comúnmente utilizada. No obstante pueden emplear otros carbohidratos como glucosa, maltosa, galactosa y sorbitol (Gamborg, 2002, Razdan, 2003).

#### **2.2.5 Agentes gelificantes**

Los medios de cultivo pueden usarse en forma líquida o semisólida, dependiendo del objetivo que se persiga. La condición semisólida del medio se adquiere adicionándole agar (producido a partir de algas marinas), que es el

gelificante más comúnmente empleado (Gamborg, 2002; Ramage y Williams, 2002).

El agar disuelto forma un gel capaz de retener el agua y absorber compuestos. Si la concentración de agar se incrementa, resulta más difícil para los explantes establecer contacto con los componentes del medio, lo cual limita su absorción. El tipo y la concentración de agentes gelificantes pueden afectar sustancialmente la efectividad de varios sistemas de cultivo de tejidos (Gamborg, 2002; Ramage y Williams, 2002).

### **2.2.6 Regulación hormonal de la morfogénesis *in vitro***

En el cultivo de tejidos vegetales *in vitro*, la manipulación eficiente de la morfogénesis depende en gran medida del uso apropiado de hormonas vegetales (HV) (Jiménez, 2005). Los estudios sobre la función de las HV llegan a ser complejos debido a que varias de ellas típicamente actúan de forma conjunta con otras y sus concentraciones en la planta cambian con el tiempo, estación y etapa de desarrollo. Algunas HV son sintetizadas localmente por las células para su propio consumo, mientras que otras son sintetizadas en un órgano y transportadas a otras partes de la planta para una acción específica. Las HV se producen en las plantas, pero se han identificado versiones naturales y sintéticas de hormonas (reguladores de crecimiento) que se suministran comúnmente a cultivos de células y tejidos (Gaspar *et al.*, 1996; Jiménez, 2005).

La adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo induce las respuestas que se desean de los tejidos vegetales. Los diferentes análogos de hormonas tienen diversos efectos dependiendo de la estructura química, tejido vegetal y genotipo. Algunas veces es necesario mezclar varios reguladores de crecimiento o dar tratamientos secuenciales con éstos para obtener los resultados deseados. Existen cinco principales grupos de fitohormonas endógenas: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno. La mayoría de estos grupos tienen múltiples funciones en el desarrollo vegetal y se emplean para manipular la morfogénesis en el cultivo de tejidos vegetales (Jiménez, 2005).

### 2.2.7 Auxinas

La primera fitohormona aislada fue la auxina el ácido indol-3-acético (AIA). Este regulador es muy inestable y es degradado rápidamente tanto en el medio de cultivo como en la planta. Por lo que a menudo se utilizan los análogos químicos por ser más estables. Las auxinas sintéticas usadas frecuentemente son el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 3-indol butírico (AIB) y el ácido 1-naftalenacético (ANA).

Las auxinas tienen múltiples funciones en el cultivo de tejidos dependiendo de su estructura química, concentración y el tejido vegetal. Las auxinas causan la producción de callos, raíces y el crecimiento de tallos. Generalmente, estimulan la elongación celular, división celular y formación de meristemos que junto con las citocininas tienen la habilidad de reprogramar a las células somáticas ya diferenciadas. Esta reprogramación causa la dediferenciación y, después la rediferenciación en una nueva ruta del desarrollo. En concentraciones elevadas, las auxinas exógenas pueden inducir la embriogénesis somática, aunque también pueden ser tóxicas debido a que estimulan la producción de etileno, el cual inhibe el crecimiento (Gaba, 2005).

### 2.2.8 Citocininas

Las citocininas promueven la división celular (citocinesis), misma que conduce a la regeneración *in vitro* de brotes, mediante promoción del crecimiento y la formación y desarrollo de meristemos apicales y laterales de brotes. Las citocininas regulan las transiciones G1-S y G2-M. Esta relación de G1-S se sustenta por el aumento de la ciclina G1, ciclina D3 y que la expresión constitutiva de la ciclina D3 causa crecimiento de callos independiente de citocininas en *Arabidopsis*. La regulación de la transición de G2-M, probablemente es mediada por la activación de CDK promovida por las citocininas a través de la desfosforilación de la CDK (Kakimoto, 2003).

La primera citocinina descubierta fue la (Kin) y poco después se identificó a la adenina como poseedora de actividad considerable de la citocinina. La zea (4-

hidroxi-3-metil-trans-2-butelinaminopurina) y la Zip son dos citocininas encontradas de manera natural y a menudo se utilizan en el cultivo de tejidos. También es común emplear citocininas sintéticas como la 6-benziladenina (BA) y el tdz (1-fenil-3-(1, 2,3-tidiazol-5-yl urea).

Las citocininas se sintetizan en los meristemos apicales de las raíces, aunque también se producen en los tejidos embrionarios y en los frutos. La BA se transporta en la planta por vía acropétala (hacia los ápices), del ápice de la raíz, donde se sintetiza, hacia los ápices y órganos en crecimiento, moviéndose a través por los vasos del xilema y se le han atribuído las siguientes funciones:

1. Estimulan la división celular y el crecimiento
2. Inhiben el desarrollo de raíces laterales
3. Rompen la latencia de las yemas axilares
4. Promueven la organogénesis en los callos
5. Retrasan la senescencia ó envejecimiento de los órganos vegetales
6. Promueven la expansión celular
7. Promueven el desarrollo y diferenciación de los cloroplastos.

El (TDZ) es uno de los sustitutos de urea estudiados por su actividad citocinina y se considera el más potente de los difenilureas que se ha evaluado para su uso en el cultivo de tejidos vegetales. Concentraciones bajas (<1µM) pueden inducir la producción de yemas axilares más que otras citocininas, pero puede inhibir el alargamiento, para evitar esto es necesario transferir los brotes a un medio de cultivo que contenga bajas concentraciones de TDZ y/o una citocinina menos activa (Thomas y Katterman, 1986; Gamborg; 2002).

Las concentraciones mayores a 1µM pueden estimular la formación de callos, brotes adventicios o embriones somáticos. El principal efecto no deseado del TDZ es la formación ocasional de brotes fasciados en algunas especies. La alta actividad citocínica y la respuesta positiva de especies leñosas al TDZ la postulan entre las citocininas más activas para la manipulación *in vitro* de muchas especies leñosas (Tomsone *et al.*, 2004).



### **2.2.9 Giberelinas**

Las giberelinas son otra clase de HV con cerca de 100 variantes identificadas en diversas fuentes, aunque todas se basan en la estructura del gibano. La actividad de las giberelinas aplicadas exógenamente varía con el tipo de giberelina y la especie vegetal. La giberelina más utilizada en el medio de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* es la AG<sub>3</sub>. En el cultivo de tejidos el AG<sub>3</sub> generalmente se usa para estimular la elongación de brotes o la conversión de yemas a brotes. El GA<sub>3</sub> interfiere con la iniciación de yemas en las primeras etapas de formación del meristemo y, por consiguiente, puede reducir la producción de brotes *in vitro* si se suministra en la etapa de iniciación de yemas de brotes. De manera similar, el GA<sub>3</sub> reduce la formación de raíces y la embriogénesis *in vitro*. Por lo tanto, para usos prácticos, es necesario optimizar los efectos del GA<sub>3</sub> en etapas específicas. También pueden tener un papel importante en la organogénesis, al estimular la diferenciación de yemas, aunque generalmente inhiben la diferenciación (Ogas, 1999; Gamborg, 2002).

### **2.2.10 Ácido Abscísico**

El ácido abscísico (ABA) se utiliza en el cultivo de tejidos para facilitar la maduración de embriones somáticos. En ciertas especies, los embriones no pueden madurar adecuadamente por la ausencia de ABA exógeno. El ABA endógeno funciona similarmente durante el desarrollo de semillas en mono y dicotiledóneas y en coníferas. El ABA induce la formación de proteínas esenciales LEA (Late Embryogenesis Abundant) presentes en las etapas finales de la embriogénesis somática y sexual. Ocasionalmente, el ABA puede estimular algunos procesos de regeneración y raramente pueden reducir la producción de embriones somáticos (Gamborg, 2002).

### **2.2.11 Nuevos reguladores del crecimiento vegetal**

Recientemente, muchos compuestos presentes de forma natural tales como las poliaminas, oligosacarinas, salicilatos, jasmonatos, esteroides, brasinoesteroides, alcoholes dehidrodiconiferil, turgorinas, cisteínas y varios inhibidores del

crecimientos han mostrado tener actividad parecida a las hormonas. También muchos nuevos productos relacionados estructuralmente se están empezando a sintetizar para varias aplicaciones agrícolas (Taji y Laksmanan, 2006).

## **2.3 Ambiente físico**

### **2.3.1 Temperatura**

La temperatura tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las plantas cultivadas *in vitro*, por lo que se deberá tener un control riguroso de ésta en las cámaras de crecimiento. Los requerimientos que de ella se tengan estarán en función de la especie que se desee propagar (Radice, 2004).

### **2.3.2 Humedad relativa**

La humedad relativa (HR) es la medida de la cantidad de vapor de agua contenida en la atmósfera gaseosa y constituye otro de los parámetros físicos que se deben tomar en cuenta en el cultivo de tejidos. La HR dependerá del sello o cobertura del envase empleado, ya que si este cierre es hermético, la humedad interior será de 100%. Si existe la posibilidad de un intercambio gaseoso, la humedad interna puede descender a niveles cercanos al 50%. Este importante descenso del contenido de HR puede promover una pérdida veloz de agua del medio de cultivo, variando la concentración de sus compuestos hasta llegar a valores tóxicos (Radice, 2004).

### **2.3.3 Luz**

La respuesta morfogénica de un explante puede variar de acuerdo al suministro de luz. Para estimular la formación de callo comúnmente se prefiere la oscuridad y la luz favorece la diferenciación de órganos. La longitud de onda, densidad de flujo y tiempo exposición son los parámetros de la luz que más influyen en la morfogénesis *in vitro* (Radice, 2004).

## 2.4 Cultivo *in vitro* de banano

La micropropagación ha sido usada para reproducir en forma masiva el banano. La propagación clonal rápida fue la principal aplicación de la técnica del cultivo de tejidos vegetales en *Musa*; otras aplicaciones importantes han sido, la erradicación de enfermedades y la conservación e intercambio de germoplasma (Robles *et al.*, 1996).

En *Musa* la escasez de plántulas para el establecimiento de nuevas plantaciones y la utilización de propágulos infectados con virus y en especial por nemátodos, representan una seria desventaja. Mediante el cultivo de tejidos en *Musa* es posible transferir al campo material sano, disponer del material de siembra en cualquier época del año, multiplicar aceleradamente genotipos deseables, transportar fácilmente los propágulos y uniformizar las plantaciones y cosecha (Robles y Mora, 1993).

La tasa de multiplicación *in vitro* tienen magnitudes más altas que la propagación convencional pero la producción de plantas *in vitro* está limitada por el genotipo (Robles 1996).

Los primeros reportes de plantas del género *Musa* producidas por cultivo *in vitro*, vinieron de Taiwán y China a principio de los años 70's (Robles y Mora, 1993). A partir de 1980, un amplio rango de especies y cultivares de *Musa*, han propagadas con éxito mediante el cultivo *in vitro* de ápices.

En *Musa* la escasez de plántula para el establecimiento de nuevas plantaciones y la utilización de propágulos infectados con virosis y en especial por nemátodos, representan una seria desventaja. Mediante el cultivo de tejidos en *Musa* es posible transferir al campo material sano, disponer del material de siembra en cualquier época del año, multiplicar aceleradamente genotipos deseables, transportar fácilmente los propágulos y uniformizar las plantaciones y cosecha (Robles y Mora, 1993).

### III MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología del Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad y en el Laboratorio de Anatomía e Histología Vegetal, del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

#### 3.1 Material vegetal

Consistió de plantas de banano de los cultivares “Enano Gigante” y “FHIA 23 regeneradas *in vitro* (Figura 1), proporcionadas por el Campo Experimental Santiago Ixc., Nayarit y el Campo Experimental Colima, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP).

#### 3.2 Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado fue el de Murashige y Skoog (MS) (1962), complementado con mio-inositol ( $100\text{mg L}^{-1}$ ), ácido nicotínico ( $100\text{ mg L}^{-1}$ ), piridoxina ( $200\text{ mg L}^{-1}$ ), tiamina ( $200\text{ mg L}^{-1}$ ), glicina ( $40\text{ mg L}^{-1}$ ), 3 % de sacarosa y 0.7 % de agar (Merck). Asimismo, se le adicionaron distintas concentraciones de reguladores de crecimiento: BA, zeo, kin, 2ip y TDZ, ( $0.5$  a  $4.0\text{ mg L}^{-1}$ ). El pH se ajustó a  $5.8 \pm 0.1$  con NaOH y HCL 0.1 N. El medio se vertió en frascos tipo gerber o magenta con 20 mL en cada uno. Luego se esterilizó en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$ ,  $115\text{ kg/cm}^3$  de presión durante 15 minutos.

#### 3.3 Condiciones de incubación

Los frascos con el material vegetal fueron crecidos en un cuarto de incubación con una temperatura de  $27^{\circ}\text{C}$  y 16 h de fotoperiodo a una intensidad lumínica de 1500 lux, así como 30 % de humedad relativa.

### **3.4 Ensayo 1. Efecto de citocininas en la regeneración de brotes de banano cv. FHIA 23.**

Se utilizaron explantes de 1 cm obtenidos de plantas plátano FHIA 23 regeneradas *in vitro*. Los explantes se colocaron en frascos con 20 mililitros de medio MS con 0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L<sup>-1</sup> de las citocininas TDZ, zeo, y 2ip, conformando un total de 10 tratamientos con 10 repeticiones cada uno, considerando como repetición un frasco con cinco explantes (30 explantes por tratamiento). Los frascos se incubaron durante 28 días en un cuarto de incubación con las condiciones antes descritas.

### **3.5 Ensayo 2. Efecto de citocininas en la regeneración de brotes del cv. Enano gigante de banano.**

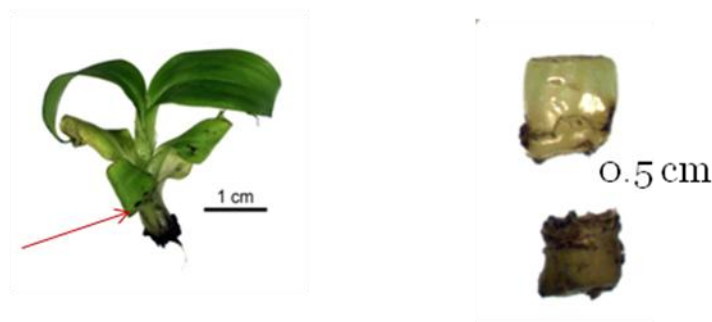
Se utilizaron explantes de 1 cm obtenidos de plantas banano cv. Enano gigante regeneradas *in vitro*. Los explantes se colocaron en frascos con 20 mililitros de medio MS con 0, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> de las citocininas BA, zeo, 2ip, y Kin, generando un total de 17 tratamientos con 10 repeticiones cada uno, considerando como repetición un frasco con cinco explantes (30 explantes por tratamiento). Los frascos se incubaron durante 28 días en un cuarto de incubación con las condiciones antes descritas.

#### **3.5.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico**

Las variables consideradas para evaluar el efecto de las citocininas en la regeneración de plantas de banano cvs. FHIA 23 y Enano gigante fueron: número de brotes que produjo cada explante, número de raíces y de hojas, así como la longitud de la planta. Los datos se sometieron un análisis de varianza en parcelas divididas y posteriormente a un diseño completamente al azar por efecto de interacción. Tal análisis se hizo mediante el Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey (con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ ).

### 3.6 Ensayo 3. Efecto del tamaño del explante en la regeneración de brotes de los cvs. FHIA 23 y Enano gigante

Con el propósito de eliminar en los explantes, los meristemos de brote preexistentes, los explantes se redujeron hasta un tamaño de 0.5 cm de longitud. Después, se colocaron en frascos con medio MS suplementado con 0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg L<sup>-1</sup> de 2ip, TDZ y BA, dando lugar a 10 tratamientos con 10 repeticiones, en donde cada repetición consistió de un frasco con cinco explantes (50 explantes por tratamiento). Los frascos que contenían los explantes se incubaron durante 28 días en una cámara de crecimiento, cuyas condiciones se describieron con anterioridad.



**Figura 1. Apariencia de los explantes reducidos (0.5 cm).**

#### 3.6.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico

Las variables evaluadas en el ensayo para evaluar el tamaño del explante fueron: el número de brotes regenerados por explante, número de raíces y hojas, y longitud de la planta. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza en parcelas divididas y posteriormente un diseño completamente al azar por efecto de interacción. Tal análisis se hizo con el Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey (con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ ).

### **3.7 Experimento 1. Evaluación de citocininas en la regeneración de brotes de los cvs. Enano gigante y FHIA 23**

Explantos de 1 cm de longitud se colocaron en frascos con medio MS al que se le adicionaron 0, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup> de BA, Zea, 2ip y Kin. Cada uno de los 17 tratamientos constó con 10 repeticiones y cada repetición consistió de un frasco con tres explantes (30 explantes por tratamiento). Los explantes fueron crecidos en una cámara de crecimiento con una temperatura de 27°C y 16 h de fotoperiodo (intensidad lumínica de 1500 lux), así como 30 % de humedad relativa.

#### **3.7.1 Variables cuantificadas y análisis estadístico**

Las variables evaluadas en el experimento para evaluar las citocininas en la regeneración de brotes de los cvs. Enano gigante y FHIA 23 fueron: número de brotes regenerados por explante, número de raíces y hojas, y longitud de la planta. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza en parcelas divididas y posteriormente a un diseño completamente al azar por efecto de interacción. Dicho análisis se hizo con el Statistical Analysis System (SAS) (SAS Institute, 2003) y para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey (con un nivel de significancia de  $p \leq 0.05$ ).

### **3.8 Análisis histológico de la diferenciación de brotes adventicios**

Este estudio se hizo en cortes de parafina de acuerdo a la técnica propuesta por Zavaleta-Mancera *et al.* (2003). Se utilizaron explantes de 1 cm de longitud de los cvs. Enano gigante y FHIA 23 que crecieron durante 21 días en medio MS adicionado con distintas concentraciones (0, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 mg L<sup>-1</sup>) de BA, Zea, 2ip y Kin.

Los explantes se fijaron en FAA: 50% alcohol isopropílico, 5% ácido acético glacial, 10% formaldehído (35 %) en agua destilada por un periodo de 24 horas. Después las muestras se lavaron con agua corriente y se colocaron en GAA (25% glicerol, 50% etanol, 25 % agua) para luego deshidratarlas e infiltrarlas en parafina mediante un procesador de tejidos automáticos (FISHER Tissuematon) programado

con las siguiente secuencias de soluciones: alcohol isopropílico (30%, 40%, 50%, 70%, 90%, 100% y 100%), isopropílico-xileno (3:1, 1:1, 1:3) y dos cambios en xileno, por espacio de 6 h en cada solución.

### **3.8.1 Inclusión en parafina**

Los explantes se transfirieron a parafina líquida (60 °C), realizando dos cambios cada 12 h, luego se colocaron en moldes de aluminio con parafina orientándolos para obtener cortes medianos del meristemo; las muestras se dejaron solidificar por 4 h.

### **3.8.2 Microtomía**

De las muestras incluidas en parafina se obtuvieron cortes medianos seriados de 10 micrómetros de grosor, con un micrótopo rotatorio (American Optical, Modelo 820). Dichos cortes se colocaron en portaobjetos con adhesivo de cromo (1 % de gelatina, 0.2 % fenol y 0.1 % de alumbre de cromo) y se calentaron a 58°C durante 1 min para extenderlos. Después se dejó escurrir el exceso de adhesivo y los portaobjetos con los cortes se colocaron en una estufa a 60 °C por 24 h.

### **3.8.3 Remoción de la parafina e hidratación del tejido**

Los cortes adheridos al portaobjetos se desparafinaron en xileno en una serie de tres cambios (3 min en cada cambio). Luego se deshidrataron en una serie de alcohol etílico (100, 70, 50%), 3 min en cada concentración.

### **3.8.4 Tinción**

Se usó la tinción policromática de safranina "O" saturada (0.05 % safranina O, 13 % (p/v) sulfato de amonio, 0.01 % fenol en agua) por 12 horas. Los cortes se enjuagaron tres veces en agua destilada para retirar los residuos de la sales y se deshidrataron en una serie de alcohol isopropílico (50%, 70% y 100%) durante 1 min en cada concentración. Luego se aplicó verde fijo FCF (0.12% de verde fijo FCF en



etanol 95%) por 1 min y se eliminó el exceso antes de pasar las muestras por alcohol isopropílico (100%) y (xileno) tres cambios de 1 min. Los cortes se montaron en resina sintética y se colocaron en una parrilla a 60 °C por 24 h, para después observarlos en un microscopio óptico (Zeiss modelo Axiostar Plus). Las imágenes fueron captadas con una cámara marca Sony modelo Mpegmovieex.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Ensayo I. Evaluación de citocininas en *Musa* 'FHIA 23'

La longitud de raíces después de 28 días de iniciado el cultivo varió de 0.28 con TDZ hasta 10.4 cm por explante el testigo, mientras la de planta osciló entre 1.49 hasta 8.84 cm. Asimismo, el número de hojas varió de 2 hasta 4 por explante y en número de brotes regenerados fue de uno.

La formación de raíces se observó 28 días después de la siembra, encontrándose diferencias entre las concentraciones de citocininas probadas. El testigo desarrolló mayor cantidad de raíces (10.46 por explante), mientras en los demás los tratamientos se formaron de 0.28 hasta 3.56 raíces por explante (Cuadro1). El menor número de raíces se obtuvo con 2 mg L<sup>-1</sup> de cualquiera de las citocininas evaluadas (Cuadro 1). En la Figura 2A, se observa la cantidad de raíces obtenida en el testigo en relación a los demás tratamientos (B, C y D).

La longitud de las plantas testigo fue mayor (8.94 cm) que el resto de los tratamientos (1.49 a 4.03 cm) con citocininas. El número de hojas por planta fue similar entre los tratamientos, aunque, el testigo superó ligeramente a los tratamientos con citocininas, nuevamente en ambas variables, la concentración de 2 mg L<sup>-1</sup> fue en la que observó los valores más bajos.

El número de brotes por explante fue de 0.1 en los tratamientos testigo y 2ip en dosis de 2 mg L<sup>-1</sup>; ninguna de las dosis de zea produjeron brotes. Con TDZ, se obtuvieron 0.0, 0.1 y 0.7 brotes por explante en la concentración de 2, 1 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, pero estos tuvieron un aspecto de roseta.

Cuadro 1. Número de raíces, hojas y brotes por explante y longitud de plantas obtenidos con distintas citocininas en explantes de banano cv. FHIA-23.

	Raíces por explante (No.)	Longitud de planta (cm)	Hojas por explante (No.)	Brotes por explante (No.)
Testigo	10.46 a <sup>z</sup>	8.84 a	4.12 a	0.08 a
2ip				
0.5	3.56 b	4.03 b	3.16 b	0.04 a
1	3.11 c	3.51 c	3.08 b	0
2	1.59 d	3.48 c	2.6 c	0.06 a
zea				
0.5	3.26 b	3.7 b	3.1 b	0 b
1	3.2 b	3.75 b	3.14 b	0 b
2	2.7 b	2.72 c	2.8 c	0 b
TDZ				
0.5	1.81 b	3.34 b	3.02 b	0.74 a
1	0.72 c	2.62 c	2.7 c	0.14 b
2	0.28 c	1.49 d	2.28 d	0 b

<sup>z</sup> Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). 2ip=2-isopenteniladenina, zea=zeatina, TDZ=thidiazuron.

En este primer ensayo los explantes de ápices de FHIA 23 cultivados en TDZ (0.5, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup>) no mostraron respuesta morfogénica y aunque no se presentaron problemas de contaminación, en todos ellos hubo arrosetamiento. Este fenómeno se observó durante los primeros 28 días después de la siembra, sin causar la muerte del explante. Lo anterior puede deberse, a que la concentración de TDZ fue alta. Al respecto, algunos autores comentan que concentraciones bajas (<1µM) de TDZ pueden inducir la producción de yemas axilares más que otras citocininas, pero puede inhibir el alargamiento, para evitar esto es necesario transferir los brotes a un medio de cultivo que contenga concentraciones más bajas y/o una citocinina menos activa (Tomas y Katterman, 1986; Gamborg, 2002).

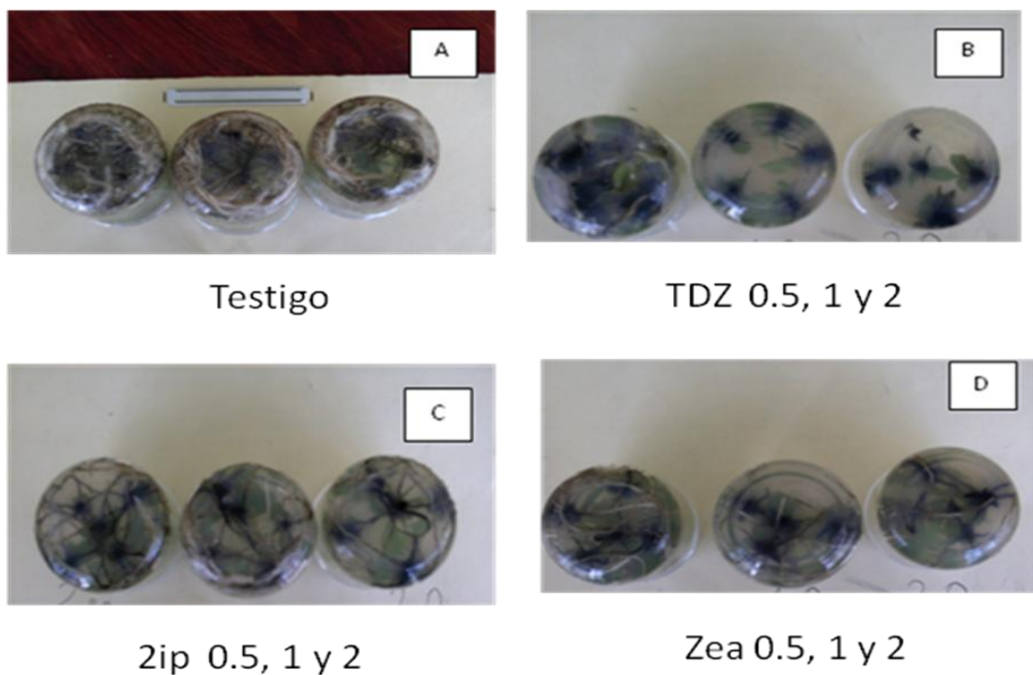


Figura 2. Desarrollo de raíces en explantes del cultivar 'FHIA 23', cultivados en distintas concentraciones (testigo 0, 0.5, 1 y 2 mg L<sup>-1</sup>) de citocininas: (A) Testigo, (B) TDZ, (C) 2ip, (D) zea.

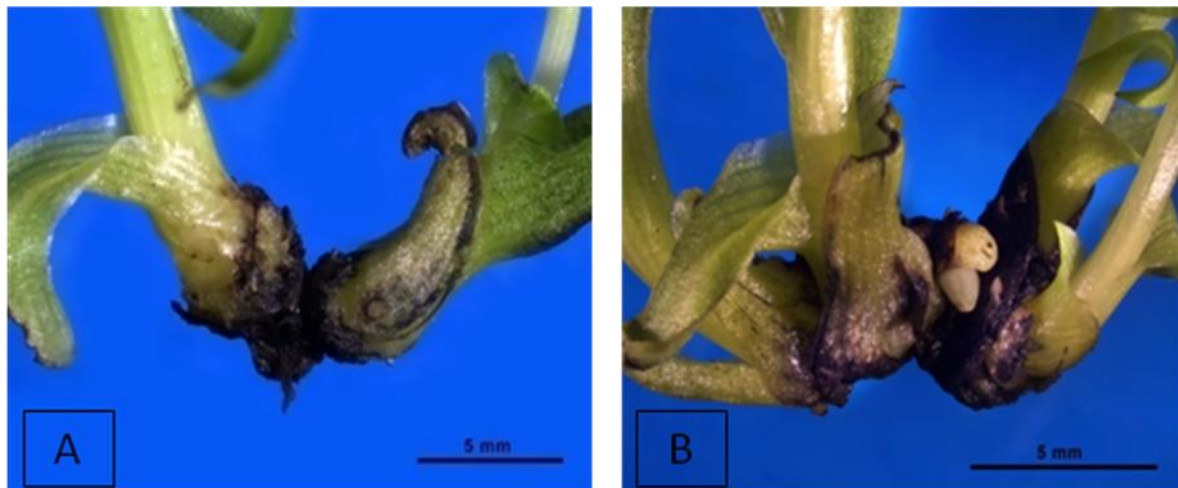


Figura 3. Explante original y proliferación de brotes nuevos. (A) 'FHIA 23.' (B) 'Enano gigante'. Barra= 5 mm.

Con base en los resultados de este ensayo se decidió modificar las concentraciones de citocininas en los siguientes ensayos, aumentando las concentraciones de citocininas para promover la formación de brotes, raíces e incrementar el número de hojas de explantes de 'FHIA 23'.

#### **4.2 Ensayo II. Evaluación de citocininas en banano 'Enano gigante'**

En el Cuadro 2, se puede observar el efecto de los tratamientos citocínicos con BA, Zea, Kin y 2ip, sobre la multiplicación de brotes regenerados, longitud de planta, número de raíces y hojas, 28 días después iniciar el cultivo.

Como se puede apreciar la brotación varió de 0 a 25 brotes por explante dependiendo de la dosis utilizada. Se observaron diferencias entre los tratamientos con BA 4 mg L<sup>-1</sup> y el testigo (sin regulador) el cual obtuvo la mayor brotación en los explantes.

Asimismo, se observó que la mayor longitud de planta (5-6 cm) se encontró con 2ip en sus cuatro concentraciones, y la menor longitud correspondió a Zea (Cuadro 2).

Cuadro 2. Número de raíces, hojas y brotes por explante, y longitud de plantas obtenidos con tratamientos citocínicos en banano cv. 'Enano gigante'

	Dosis mg L <sup>-1</sup>	Longitud de planta (cm)			Hojas por planta (No.)		Raíces por planta (No.)			Brotes por explante (No.)
		1-2	3-4	5-6	3-4	5-6	2-3	4-5	6-7	
		2 ip	1	3	9	18	13	17	14	
	2	6	11	13	14	16	13	9	8	0
	3	4	8	18	18	12	15	6	9	0
	4	4	6	20	20	10	13	8	9	0
BA	1	7	15	8	17	13	7	8	15	8
	2	8	17	5	20	10	7	8	15	9
	3	7	18	5	18	12	6	13	11	6
	4	7	17	6	16	14	5	9	16	11
zea	1	13	10	7	20	10	16	6	8	0
	2	18	8	4	22	8	14	9	7	0
	3	18	9	3	23	7	16	7	7	3
	4	16	9	5	25	5	17	5	8	0
Kin	1	5	16	9	20	10	10	11	9	1
	2	8	15	7	19	11	13	9	8	2
	3	8	17	5	17	13	12	9	9	1
	4	11	15	4	18	12	14	8	8	2
Testigo	0	2	3	25	0	30	0	11	19	25

En cuanto al número de hojas por planta, sobresalió el testigo y los tratamientos que contenían 2ip. Las dosis de 2, 3 y 4 mg L<sup>-1</sup> de Zea produjeron menos plantas que contenían de 5 a 6 hojas. La mayoría de los explantes tratados con BA, Zea y Kin sólo produjeron de 3 a 4 hojas por explante (Cuadro 2).

Por otro lado, el mayor número de raíces (6 a 7) se obtuvo en el tratamiento testigo, y los que contenían BA en todas sus concentraciones; mientras que en los demás tratamientos se produjeron 2 y 3 raíces. La menor respuesta se obtuvo en los explantes cultivados con zea.

Los resultados indican que los valores más altos para las variables de brotación y número de raíces por explante, se obtuvieron en el testigo y en los tratamientos con BA en todas sus concentraciones. El testigo también tuvo el mayor número de hojas y zea el menor. El testigo y BA indujeron plantas más grandes (Cuadro 2).

Se presentó contaminación por bacterias y oxidación en la propagación de explantes en ambos cultivares y en todos los tratamientos evaluados. Respecto a la contaminación (Figura 4A), se observó la presencia de una bacteria aun cuando se utilizó el PPM (Mezcla para preservar plantas), en el medio de cultivo. Esta situación ocasionó la pérdida de todos los explantes ya que se tenía que desechar todo el material para evitar una contaminación mayor al utilizar dichos explantes que aparentemente se veían sanos. La contaminación probablemente se debió a diversos motivos; pudo darse por un descuido al momento de transferir a otro medio, o bien, con la manipulación de los materiales utilizados cuando estos no son manejados con los cuidados necesarios; bien sea que no se desinfecten adecuadamente las herramientas después de cada explante procesado o también que no hayan estado esterilizados antes de usarse. También pudo deberse a que el medio de cultivo no haya estado bien tapado o bien que el medio permaneciera fuera del cuarto de siembra y no se hubiera dado el tiempo necesario en la esterilización. También pudo ser por el tamaño del explante utilizado, ya que explantes más grande (mayor a 1 cm) es mayor el riesgo de contaminación.

La oxidación, en los explantes se mostró como zonas oscuras tanto en las hojas como en la parte del cormo, que ocasionaron la muerte lenta del tejido (Figura 4B).

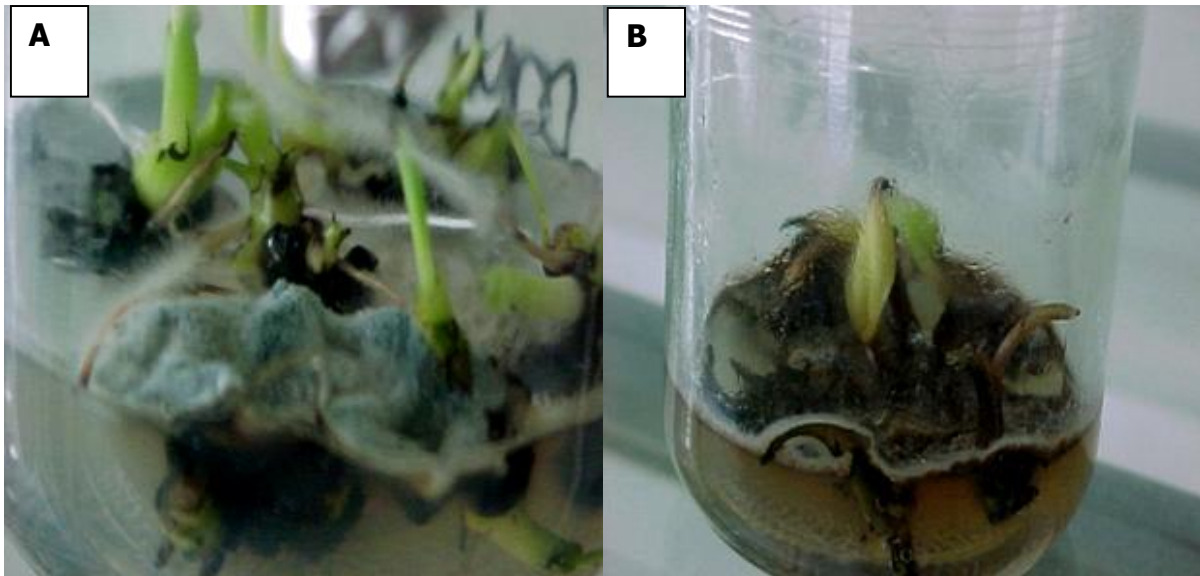


Figura 4. Explantes de *Musa* con problemas de contaminación (A) y oxidación (B).

#### 4.3 Ensayo III. Reducción del explante ‘Enano gigante’ y ‘FHIA 23’

En este ensayo se redujo el tamaño de los explantes de 1.0 a 0.5 cm, separando el cormo del pseudotallo (Figura 1), con el propósito de evaluar si con ésto se podrían eliminar puntos meristemáticos pre-existentes y así asegurar que toda la brotación obtenida fuera producto de regeneración de *novo*.

Con esta reducción del explante se presentó mayor oxidación en respuesta a los cortes (heridas) realizados, razón por la que se adicionó ácido ascórbico al medio de cultivo como antioxidante. También se observó que los explantes no regeneraron brotes, debido a que los explantes murieron lentamente, por la presencia de fenoles. Varios autores (Salazar y Surga, 1988; Taji *et al.*, 2002) comentan que es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del objetivo que se persiga, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos y que los explantes muy



pequeños suelen requerir del empleo de medios de cultivo complejos. Con base en estas observaciones se decidió montar los experimentos siguientes con explantes de una longitud mínima de 1 cm.

#### **4.4 Experimento I. Evaluación de cuatro citocininas ‘Enano gigante’ y ‘FHIA 23’**

Los explantes del cv. ‘Enano gigante’ del tratamiento testigo formaron 8.7 brotes por explante, en tanto que con 4 mg L<sup>-1</sup> BA, se obtuvieron 10.1 brotes por explante siendo el valor más alto estadísticamente (Cuadro 3). La producción de raíces por explante más alta fue observada en el testigo (11.3), aunque con 2ip se observaron 9.98, 10.03 y 10.06 raíces por explante en las dosis 2, 1 y 4 mg L<sup>-1</sup>, siendo estadísticamente iguales al testigo. El tratamiento con BA mg L<sup>-1</sup>, fue el que generó el menor número de raíces (2.36). Respecto al número de hojas, este fue similar en todos los tratamientos con un rango de 4.0 a 5.75 por explante. El testigo y los tratamientos con 2ip, produjeron plantas más grandes con una longitud entre 5.52 y 6.67, siendo estadísticamente iguales. Los brotes obtenidos Zea y Kin en las dosis de 1 mg L<sup>-1</sup> (4.8 y 5.0 cm de longitud, respectivamente) no fueron estadísticamente diferentes.

En el cv ‘FHIA 23’, se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre las concentraciones de BA probadas siendo 4 mg L<sup>-1</sup> la mejor (6.83 brotes por explante) con respecto a las demás concentraciones y el testigo (5.76 brotes). Los explantes tratados con 2 y 4 mg L<sup>-1</sup> de 2ip no produjeron brotes. El mayor número de raíces se obtuvo con 1, 2 y 3 mg L<sup>-1</sup> de este regulador (3.41, 2.81 y 3.85 raíces por explante). Dicha respuesta no mostró diferencias significativas con respecto a la obtenida con 2 y 3 mg L<sup>-1</sup> de Kin (3.65 y 3.0 raíces por explante). Las plantas tratadas con 4 mg L<sup>-1</sup> de zea, y 2 y 4 mg L<sup>-1</sup> BA no produjeron raíces. Respecto al número de hojas por planta, se encontró que la mayoría de las dosis de Kin produjeron más de 3 hojas por planta, a excepción de 1 mg L<sup>-1</sup> de Kin que indujo 2.63 hojas.

Cuadro 3. Número de raíces, hojas y brotes por explante y longitud de plantas obtenidos con tratamientos citocínicos en banano cv. 'Enano gigante'

Dosis mg L <sup>-1</sup>	Raíces por explante (No.)	Longitud de planta (cm)	Brotes por explante (No.)	Hojas por explante (No.)
Testigo	11.33 a	5.58 a	8.70 a	4.71 a
2 ip 1	10.03 a	5.52 a	0 e	5.15 a
2	9.98 a	5.65 a	0 e	5.15 a
3	9.03 b	5.87 a	0 e	5.26 a
4	10.06 a	6.67 a	0.08 e	5.75 a
zea 1	6.90 c	4.88 a	0.01 e	4.66 a
2	5.30 c	4.31 b	0 e	4.06 a
3	6.33 c	4.50 b	0.15 e	4.60 a
4	4.28 d	4.01 b	0.18 e	4.43 a
BA 1	5.46 c	4.11 b	4.61 c	4.00 a
2	5.06 d	4.21 b	6.15 b	4.78 a
3	4.85 d	3.98 b	5.21 c	4.47 a
4	2.36 e	3.43 b	10.10 a	4.35 a
Kin 1	6.98 c	5.04 a	2.06 d	4.8 a
2	5.60 c	4.13 b	2.23 d	4.28 a
3	6.28 c	4.44 b	2.51 d	4.08 a
4	6.13 c	4.61 b	2.78 d	4.21 a
Significancia	*	*	*	Ns

<sup>z</sup> Medias con letras distintas entre columnas son significativamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). 2ip=2-isopenteniladenina, zea=zeatina, BA=Bencilaminopurina, Kin=Kinetina.

Los tratamientos con 3 mg L<sup>-1</sup> BA y 1 y 3 mg L<sup>-1</sup> de 2ip produjeron también más de 3 hojas por explante siendo estadísticamente igual a los anteriores. De la misma manera que para el número de hojas, la mayoría de los tratamientos de Kin formaron las plantas más grandes con una longitud de 3.18 a 3.91 cm, a excepción

del tratamiento con 1 mg L<sup>-1</sup> que tuvo una longitud de 2.30 y nuevamente 2ip (1 y 3 mg L<sup>-1</sup>) tuvo plantas con una longitud mayor a los 3 cm. La longitud en el testigo fue de 1.89 cm.

Cuadro 4. Número de raíces, hojas y brotes por explante y longitud de plantas obtenidos con tratamientos citocínicos en banano cv. 'FHIA 23'.

Dosis mg L <sup>-1</sup>	Raíces por			
	explante (No.)	Longitud de planta (cm)	Brotes por explante (No.)	Hojas por explante (No.)
Testigo	1.40 a	1.89 b	5.76 b	2.63 b
2 ip 1	3.41 a	3.47 a	0.30 g	3.30 a
2	2.81 a	2.16 b	0 g	2.41 b
3	3.85 a	3.34 a	0.10 g	3.33 a
4	1.33 c	1.64 c	0 g	1.85 b
zea 1	0.41 d	1.88 b	0.20 g	2.16 b
2	0.03 d	1.58 c	0.26 g	1.98 b
3	0.03 d	2.00 b	0.67 g	2.15 b
4	0 d	1.58 c	0.61 g	2.21 b
BA 1	0.10 d	2.09 b	3.98 c	2.20 b
2	0 d	1.79 b	5.23 b	2.35 b
3	0.05 d	2.54 b	4.43 c	3.01 a
4	0 d	1.83 b	6.83 a	2.08 b
Kin 1	1.75 b	2.30 b	1.63 e	2.63 b
2	3.65 a	3.91 a	1.45 f	3.76 a
3	3.00 a	3.18 a	2.13 e	3.03 a
4	1.95 b	3.21 a	2.23 e	3.35 a
Significancia	*	*	*	*

<sup>z</sup> Medias con la misma letra entre columnas son similares estadísticamente (Tukey, P 0.05). 2ip=2-isopenteniladenina, zea=zeatina, BA=Bencilaminopurina, Kin=Kinetina.

Los dos cultivares estudiados poseen una morfología similar (Figura 5); no obstante, los resultados obtenidos en ambos cultivares, indican que el potencial de regeneración y multiplicación no es similar entre ellos; por ejemplo, Enano gigante se propagó más fácilmente en las diferentes concentraciones de citocininas que FHIA 23. Las plantas de 'Enano gigante' producidas también fueron de mayor tamaño que las de 'FHIA 23' y éstas producen menor número de hojas.

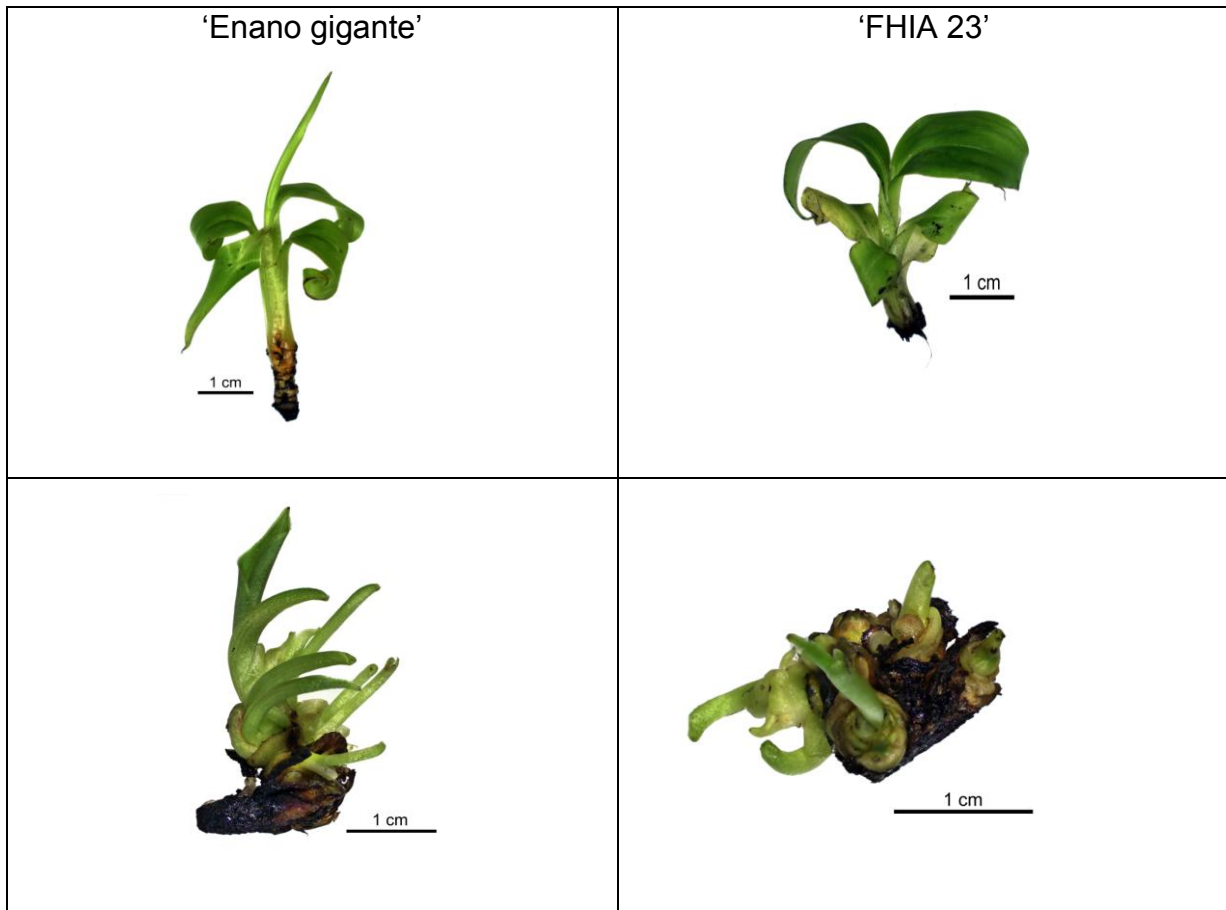


Figura 5. Diferencias morfológicas entre genotipos 'Enano gigante' y 'FHIA 23'

#### 4.5 Análisis histológico de los brotes adventicios

Este estudio tuvo como finalidad identificar la procedencia y localización de los brotes que se desarrollaron en cada tratamiento probado y se llevó a cabo durante la fase de inducción de brotes de los cultivares 'Enano gigante' y 'FHIA 23'. Los cortes se efectuaron a partir de explantes cultivados en medio MS suplementado con 1, 2, 3 y 4 mg L<sup>-1</sup> de 2ip, zeo, BA y Kin.

Los resultados indican que en los dos genotipos estudiados las plantas se regeneraron tanto de yemas axilares pre-existentes como brotes adventicios formados *de novo*. En el caso de los brotes adventicios tuvieron su origen a partir de puntos meristemáticos localizados por debajo de la inserción de las primeras hojas, mientras que los puntos meristemáticos ubicados por arriba de éstas dieron lugar a brotes axilares.

Li *et al.*, (2006) estudiaron el origen histológico durante la regeneración de plantas vía organogénesis directa del banano 'Williams' y encontraron que la mayoría de los brotes adventicios fueron obtenidos de la región cercana al meristemo apical y mencionan que el origen fue multicelular a partir de capas de células con una activa división celular en la epidermis de la axila de la hoja. Lo cual no coincide con nuestros resultados, ya que en este estudio, estos brotes fueron encontrados en la parte basal del explante (cormo). Por otro lado, en el mismo cultivar propagado *in vitro* bajo diferentes dosis de BA, Ramírez *et al.*, (2008), mediante un estudio histológico, mostraron la organización citohistológica de la capa de la túnica del ápice del brote, la cual mostró que es unicelular en comparación con otros bananos como Dwarf Cavendish y Red Banana en los que la túnica presenta dos y tres capas celulares respectivamente.

En 'Enano gigante' el uso de la cinetina en el medio de cultivo promovió la formación de brotes adventicios en todas las dosis utilizadas, no así con las otras citocininas y el testigo. La formación de estos brotes varió dependiendo de la dosis utilizada; con  $1 \text{ mg L}^{-1}$  se obtuvieron 1.66 brotes adventicios; mientras que con  $4 \text{ mg L}^{-1}$ , el número de brotes se incrementó hasta  $5.33 \text{ mg L}^{-1}$ ; es decir, a mayor dosis utilizada mayor formación de brotes adventicios (Figura 6).

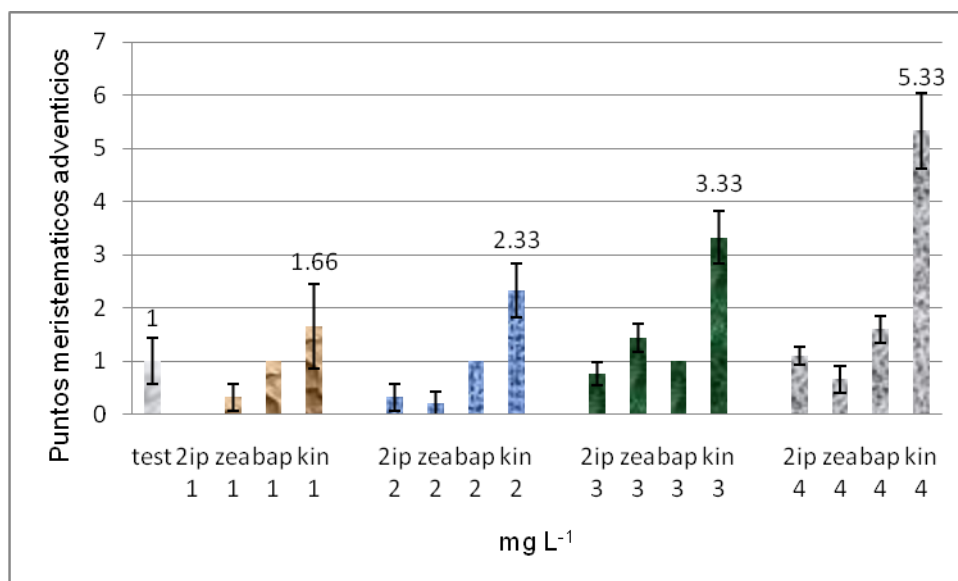


Figura 6. Puntos meristemáticos adventicios observados en cortes longitudinales de explantes del cultivar 'Enano gigante', crecidos en distintas citocininas y concentraciones de las mismas. Test= testigo, 2ip=2-isopenteniladenina, zea=zeatina, BA=Bencilaminopurina, Kin=Kinetina.

En la Figura 7, se muestra los primordios que dieron lugar a los brotes adventicios, estos emergían por debajo de la raíz en la parte del cormo. Estos puntos meristemáticos fueron observados en todas las dosis de Zea, kin, 2ip y BA (1, 2, 3 y 4 mg L<sup>-1</sup>) evaluadas; siendo los tratamientos con cinetina los que formaron el mayor número.

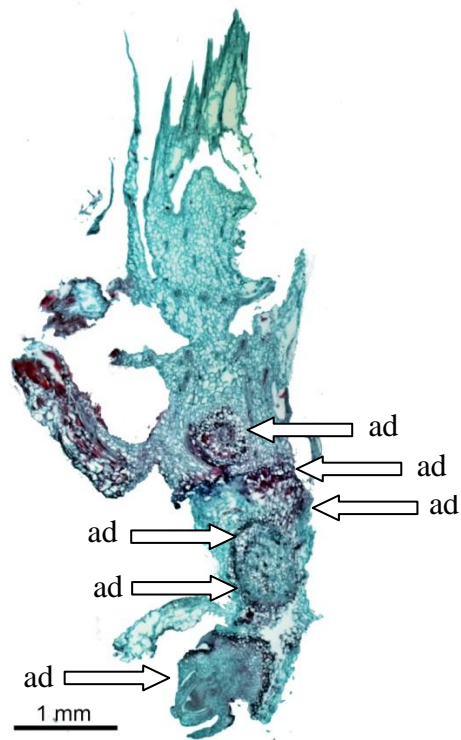


Figura 7. Corte longitudinal de un explante del cv. Enano gigante cultivado en presencia de  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de kinetina. ad = puntos meristemáticos adventicios

Resultados similares en la formación de brotes adventicios se encontraron en banano 'FHIA 23' con el tratamiento de kin; las dosis de 3 y  $4 \text{ mg L}^{-1}$  produjeron de 2.5 a 3 puntos meristemáticos (Figura 8). En la misma figura, se aprecia que en los tratamientos con Zea no hubo formación de estos puntos en ninguna de las dosis utilizadas. En 'Enano gigante' y 'FHIA 23' los primordios emergían por debajo de la raíz (Figura 7 y 9).

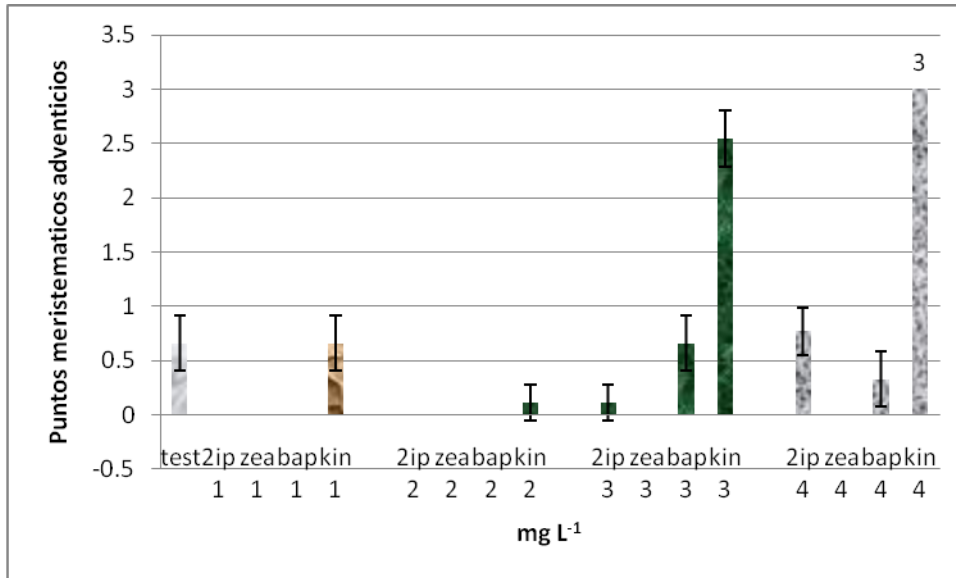


Figura 8. Puntos meristemáticos adventicios observados en cortes longitudinales de explantes del cultivar FHIA 23, crecidos en distintas citocininas y concentraciones de las mismas. Test= testigo, 2ip=2-isopenteniladenina, zea=zeatina, BA=Bencilaminopurina, Kin=Kinetina.

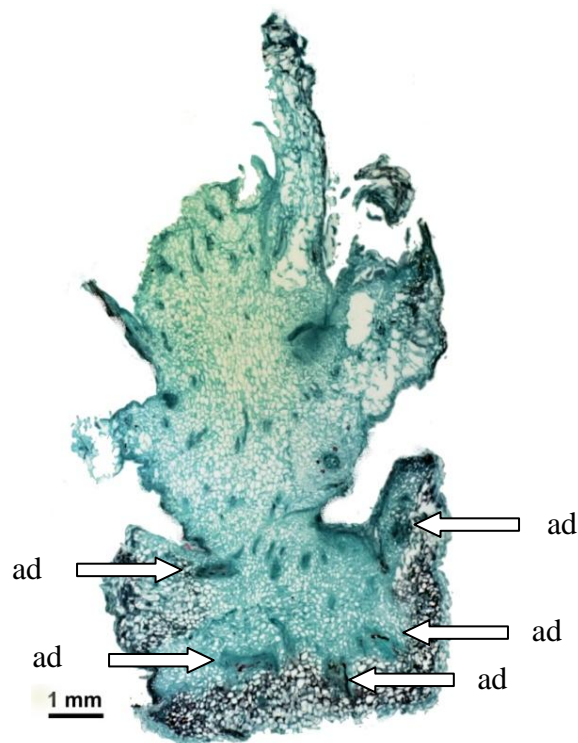


Figura 9. Corte longitudinal de un explante del cv. FHIA-23 cultivado en presencia de 4 mg L<sup>-1</sup> de kinetina. ad = puntos meristemáticos adventicios.



Respecto a los puntos meristemáticos que dan origen a los brotes axilares, en 'Enano gigante' se encontró que estos se formaron en todas las dosis de citocininas evaluadas. BA a 3 y 4 mg L<sup>-1</sup> formó el mayor número de puntos meristemáticos (4 y 7.7, respectivamente), en tanto que el tratamiento con 3 mg L<sup>-1</sup> de 2ip promovió la menor cantidad de estas estructuras (1.88), mientras que en el testigo se formaron 3.66 puntos meristemáticos (Figura 10).

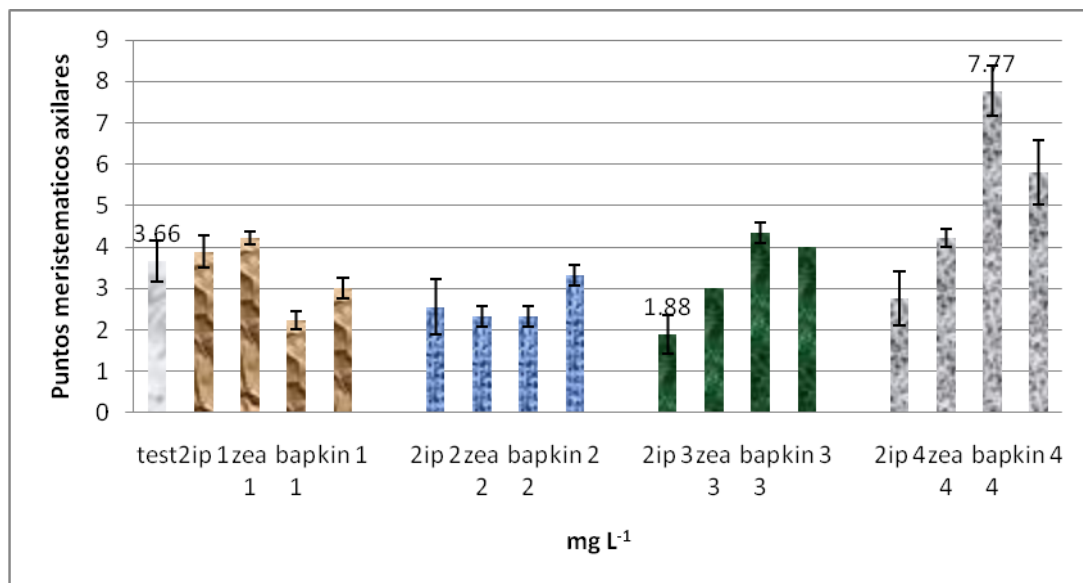


Figura 10. Puntos meristemáticos axilares observados en cortes longitudinales de explantes del cultivar Enano gigante, crecidos en distintas citocininas y concentraciones de las mismas. Test= testigo, 2ip=2-isopenteniladenina, zeo=zeatina, BA=Bencilaminopurina, Kin=Kinetina.

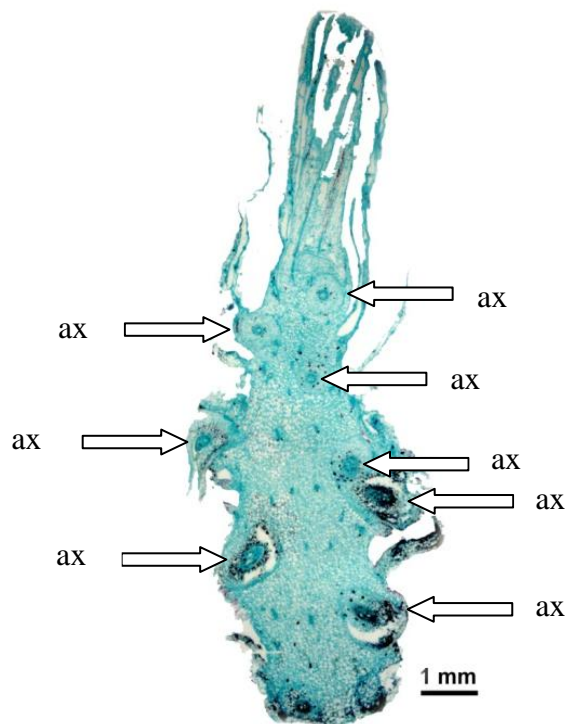


Figura 11. Corte longitudinal de un explante del cv. Enano gigante cultivado en presencia de 4 mg L<sup>-1</sup> de BA. Ax = puntos meristemáticos axilares.

En FHIA 23, se encontraron resultados similares a los de 'Enano gigante' en la formación de puntos meristemáticos axilares (Figura 12), ya que en todos los tratamientos se observó la formación de estas estructuras; aunque en el tratamiento con 4 mg L<sup>-1</sup> de BA se observó el mayor número de puntos meristemáticos (5.77). Por su parte, el testigo se formó hasta 2.11 puntos meristemáticos axilares (Figura 13).

El estudio histológico permitió identificar y describir con mayor detalle la ubicación de puntos meristemáticos que dan origen a brotes adventicios y axilares. Los puntos meristemáticos observados fueron formados por el efecto de las citocininas evaluadas ya que estas promueven la división celular (citocinesis), misma que conduce a la regeneración *in vitro* de brotes (Kakimoto, 2003). No obstante, las diferencias observadas entre los tratamientos, indican, que algunas de las citocininas probadas tienen un mayor efecto que otras a una misma dosis.

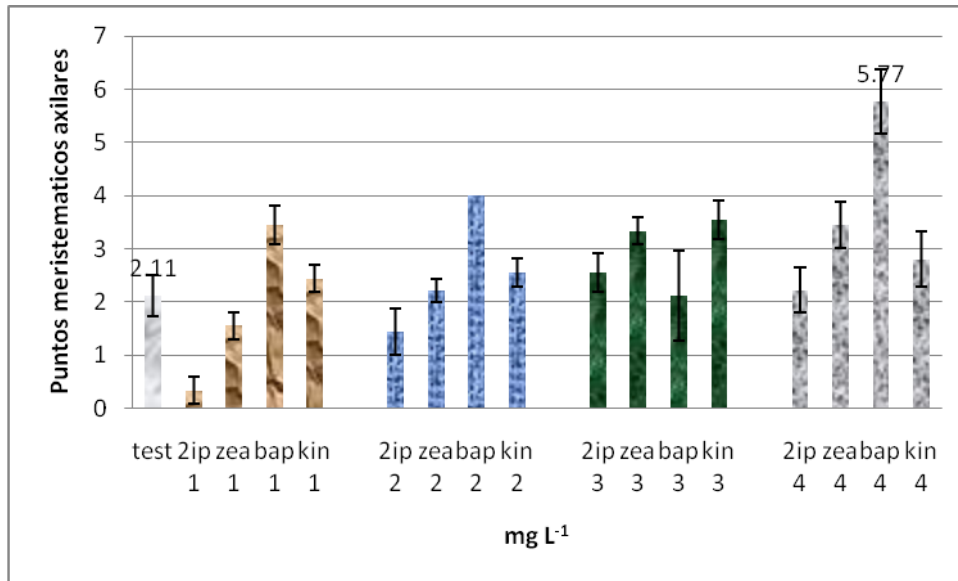


Figura 12. Puntos meristemáticos axilares observados en cortes longitudinales de explantes del cultivar FHIA 23, crecidos en distintas citocininas y concentraciones de las mismas. Test= testigo, 2ip=2-isopenteniladenina, zea=zeatina, BA=Bencilaminopurina, Kin=Kinetina.

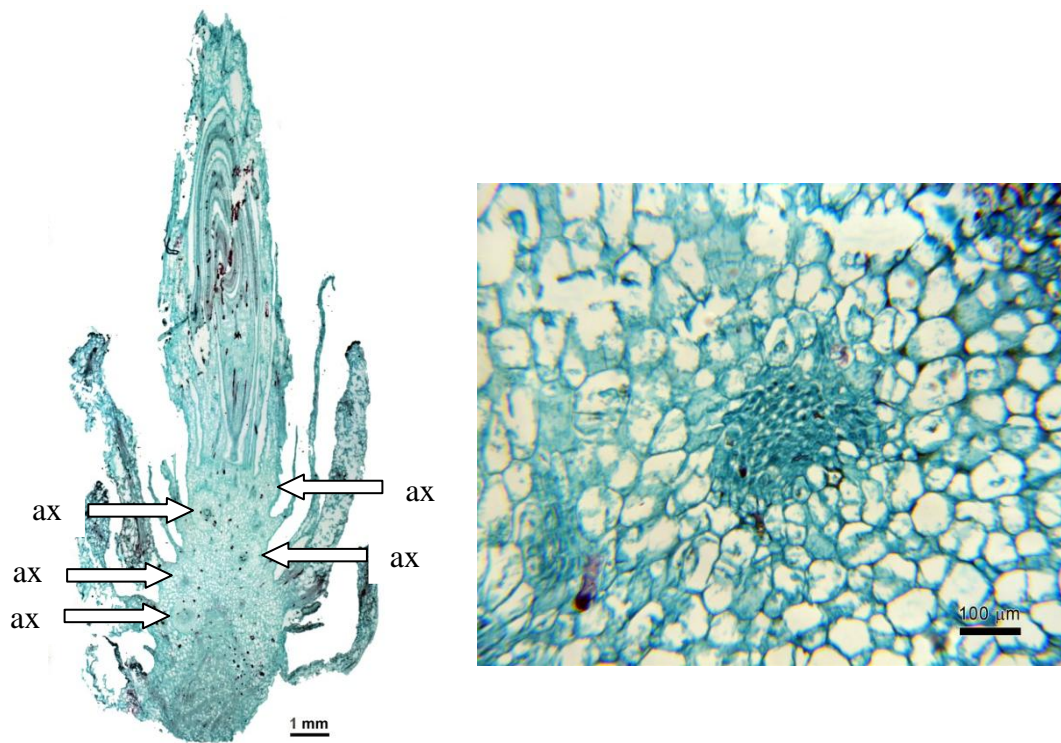


Figura 13. Corte longitudinal de un explante del cv. FHIA 23 cultivado en presencia de  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BA. ax = puntos meristemáticos axilares. Acercamiento de centro meristemático, parénquima con células lignificadas.

## V CONCLUSIONES

Es factible utilizar la técnica de cultivo de tejidos para la regeneración *in vitro* vía organogénesis directa *de novo* de los cultivares 'Enano gigante' y 'FHIA 23' de banano (*Musa sp.*).

Incluir 4 mg L<sup>-1</sup> de kin en el medio de cultivo indujo el mayor número de brotes adventicios por explante, los cuales tuvieron la capacidad de formar plantas.

La capacidad morfogénica para formar brotes vegetativos fue expresada de manera diferencial entre los cultivares de banano 'Enano gigante' y 'FHIA 23'.

Los tratamientos que incluyeron 2ip no lograron inducir la formación de brotes cuando se redujo el tamaño del explante a 0.5 cm. El tamaño óptimo del explante es de 1.0 cm centímetro y éste incluye pseudotallo y cormo.

Histológicamente se determinó que los puntos meristemáticos axilares se desarrollan en la axila de las hojas, y los adventicios en la base del explante, a partir del procambium.

El estudio histológico mostró que el número de puntos meristemáticos axilares inducidos en ambos cultivares fue mayor en presencia de 4mg L<sup>-1</sup> BA, en tanto que la mayor cantidad de puntos meristemáticos adventicios se obtuvo con 4 mg L<sup>-1</sup> de kin.

Se puede concluir que para la transformación genética las zonas de crecimiento útiles serían los puntos meristemáticos adventicios que se inducen al emplear 4mg L<sup>-1</sup> de Kin.

## VI RECOMENDACIONES

Dependiendo de la finalidad de la micropropagación es importante tener en cuenta que la mejor respuesta en cuanto a la formación de brotes adventicios se obtiene al cultivar los explantes en  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de Kin; mientras que la proliferación de brotes ocurre con mayor frecuencia en un medio de cultivo con  $4 \text{ mg L}^{-1}$  de BA.

## VII LITERATURA CITADA

B. Ali and S. Hasnain. 2006. Potential of Bacterial Indolacetic Acid to Induce Adventitious Shoot in Plant Tissue Culture Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of the Pujab. Quaid –e-Azam Campus, Lahore, Pakistán P. 1-18.

Daquita, M.; Ramos, L.; Capote, I.; Lezcano, Y.; (2006) Inducción de callo y regeneración de plantas en *Tectona grandis* L. Rev. Biotecnología Vegetal. 1(2):15-19.

Daquita, M.; Lescano, Y.; Escalena, M.; M.; y Santos, R. (2000). Multiplicación *In vitro* de Banano FHIA-18 con paclobutrazol y thidiazuron en diferentes formas de cultivo, Rev. Brasileira de Fruticultura 22(1):86-88.

Debergh, P. C., and L. J. Maene. 1981. A. scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Scientia Hort. 14: 335-345.

E. Caboni, S. D'Angel; A. Chiappitta. 2001. Adventitious Shoot Regeneration from Vegetative shoots apices in Pear and putative role of cytokinins accumulation in the morphogenetic process Pp. 5-19. Scientia Hort. 14: 375-395.

Ezhova, T. A. 2003. Genetic control of totipotency of plant cells in an *in vitro* culture. Russian Journal of Developmental Biology 43:197-204.

Gaba, V. P. 2005. Plant growth regulators in plant tissue culture and development. In: *Plant development and Biotechnology*. (Ed.) R. N. Trigiano and D. J. Gray. CRC Press. Boca Raton, FL. pp 87-99.

Gamborg, O. L. 2002. Plant tissue culture. Biotechnology. Milestones. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant. 38:84-62.

García, R. L.; Bermúdez, C. I.; Orellana, P. P.; 2000, Inducción de mutaciones gamma en el cultivo *in vitro* de brotes del cultivar Gran Enano (AAB), Rev. Biotecnología Vegetal, 1(1):45-50.

Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid, and T. A. Thorpe. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 32: 305-315.

George, E. F., and P. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture.

<http://www.Infoagro/frutales/plátano>.

Jimenez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regul.* 47:91-110.

Kakimoto, T. 2003. Perception and signal transduction of cytokinins. *Rev. Plant Biol.* 54: 605-627.

Lakshmi, S. G., Vaidyanathan, C. S. and Ramakrisnan, T. 1982. Applied aspect of plants tissue culture with special reference to tree improvement. *Curr. Sci. (Gangalore)*, 51(2):88-92.

Li, J.; X. L. Huang; Y. R. Wei; X. Huang; Z. Li and X. J. Li 2006. Histological analysis of direct organogenesis from micro-cross-sections of cultures of the banana. *Australian Journal of Botany* 54(6) 595–599. .

Litz, R. R. 1993. Organogenesis and somatic embryogenesis. *Acta Hort.* 336:199-205.

Manzur M., D. 2001. *In situ* mass Propagation of the FHIA-20 Banana Using benzylaminopurine. *INFORMUSA*, 10(1):3-5.

Migueles, S. Y.; Trujillo, S. R.; Daquita, G. M. 2001 Micro propagación de *Dieffenbachia Picta*, Rev. Biotecnología Vegetal, 1 (1): 49-55.



Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 5: 473-497.

Narayaswamy, S. 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: Applied and fundamental aspect of plant cell, tissue and organ culture. Baajaj, Y. P. S. (Eds.). 191 p. Springer-Verlag, Berlin.

Ogas, J. 1999. Giberellins. *Current Biology* 10: 24-25.

Orellana, P. P.; García, L.; Bermúdez, I.; 2002, Manejo de hijos y ápices de cultivares de (*Musa sp.*) para iniciar la micro propagación y comportamiento durante seis subcultivos *in vitro*, *Rev. Biotecnología Vegetal*, 2(2):77-81.

Orozco R., J.; Medina U., M. y Becerra R., S. 1993. Guía para producir plátano en la zona Costera de Colima, Michoacán y Jalisco. Folleto para productores No. 2. SARH-INIFAP-CIPAC. 25 P.

Radice, S. 2004. Morfogénesis *in vitro*. In: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. (Ed.) Echenique, V., Rubistein, C. y Mroginski, L. INTA. Buenos Aires, Argentina. pp 27-36.

Ramage, C. M., and R. R. Williams. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 38: 116-124.

Ramírez V., M.; H. Lindorf; y E. de García. 2008. Cambios morfoanatómicos en los ápices del vástago y de la raíz del banano Williams (AAA, *Musa sp*) bajo distintas concentraciones de N<sup>6</sup>-Benciladenina. *J. Agric. Univ. P.* 92(1-2):53-72

Razdan, M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. 2nd ed. Science Publishers. Inc. Enfield, NH, USA. 388 p.

Robles G., M. M. 1993. Propagación de banano por cultivo de tejidos. Desplegable para productores No. 2. SARH-INIFAP-CIPAC.

Robles G., M. M. 1996. Producción de Enano Gigante mediante la técnica de cultivo de tejidos. Folleto par productores. Numero 1. INIFAP, CIPAC, CE Tecoman, Jalisco. México. 12 p.

Salazar, E. D., and J. G. Surga. 1988. Methods of disinfection of sugarcane explants cultured *in vitro*. Caña de Azúcar 6: 105-112.

SAS Institute. 2003. SAS/STAT User's Guide. Inst.Inc.

Stasolla, C., M. S. Lam, and E. C. Yeung. 2006. Exogenous applications of ascorbic acid enhance shoot apical meristem growth and induce shoot organogenesis in germinating white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. International Journal of Plant Sciences 167: 429-436.

Stewart, F. C., Chaplin, S. M. and Millar, F. K. 1952. Investigations of metabolism of plant cell. Ann. Bot. 16:58-77.

Street, H. E. 1977. Plant tissue and cell culture. Ed. Academia Press. U. S. A. 1-10.

Sugiyama, M. 2000. Genetic analysis of plant morphogenesis *in vitro*. Int. Rev. Cytol. 196: 67-4.

Taji, A., and P. Lasmanan. 2006. Emerging themes *in vitro* culture and their applications to horticulture. Acta Hort. 725: 241-253.

Taji, A., P. P. Kumar, and P. Laksmanan. 2002. *In vitro* plant breeding. Food Products Press. New York, USA. 167 p.

Thomas, J. C., and F. R. Katterman. 1986. Cytokinin activity induced by thidiazuron. Plant Physiol. 81: 681-683.

Thorpe, T. A., and I. S. Harry. 1997. Application of tissue culture to horticulture. Hort. 447:39-45.

Tomsone, S., D. Gertnere, and D. Novikova. 2004. The influence of thidiazuron on shoot regeneration and proliferation of rhododendrons *in vitro*. Acta Universitatis Latviensis Biology 676: 239-242.

Williams, R. R. 1993. Mineral nutrition *in vitro* – A mechanistic approach. Aust. Bot. 41: 237-251.

Zhang, S., and P. G. Lemaux. 2004. Molecular analysis of *in vitro* shoot organogenesis. Crit. Rev. Plant Sci. 23: 325-335.

## VIII APENDICE

1A. Efecto de citocininas en la inducción de puntos meristematicos adventicios y axilares en Enano gigante. ANVA parcelas divididas y posteriormente diseño completamente al azar por efecto de interacción. Estudio histológico.

<b>Enano gigante</b>		
	<b>Puntos Adv.</b>	<b>Puntos Axil.</b>
<b>Citocinina</b>	<b>Medias</b>	
<b>Dosis mgL<sup>-1</sup></b>		
<b>2 ip</b>		
<b>0</b>	<b>1.00 c</b>	<b>3.66 c</b>
<b>1</b>	<b>0.00 d</b>	<b>3.88 b</b>
<b>2</b>	<b>0.33 d</b>	<b>2.55 d</b>
<b>3</b>	<b>0.77 d</b>	<b>1.88 e</b>
<b>4</b>	<b>1.10 c</b>	<b>2.77 d</b>
<b>zea</b>		
<b>1</b>	<b>0.33 d</b>	<b>4.22 c</b>
<b>2</b>	<b>0.22 d</b>	<b>2.33 d</b>
<b>3</b>	<b>1.44 c</b>	<b>3.00 d</b>
<b>4</b>	<b>0.66 d</b>	<b>4.22 c</b>
<b>BA</b>		
<b>1</b>	<b>1.00 c</b>	<b>2.22 d</b>
<b>2</b>	<b>1.00 c</b>	<b>2.33 d</b>
<b>3</b>	<b>1.00 c</b>	<b>4.33 c</b>
<b>4</b>	<b>1.66 c</b>	<b>7.77 a</b>
<b>Kin</b>		
<b>1</b>	<b>1.66 c</b>	<b>3.00 d</b>
<b>2</b>	<b>2.33 c</b>	<b>3.33 d</b>
<b>3</b>	<b>3.33 b</b>	<b>4.00 c</b>
<b>4</b>	<b>5.33 a</b>	<b>5.88 b</b>

<sup>z</sup> Medias con la misma letra entre columnas son iguales estadísticamente (Tukey, P 0.05).

2A. Efecto de citocininas en la inducción de puntos meristematicos adventicios y axilares en FHIA 23. ANVA parcelas divididas y posteriormente diseño completamente al azar por efecto de interacción. Estudio histológico.

<b>FHIA 23</b>		
	<b>Puntos Adv.</b>	<b>Puntos Axil.</b>
<b>Citocinina</b>	<b>Medias</b>	
<b>Dosis mgL<sup>-1</sup></b>		
<b>2 ip</b>		
<b>0</b>	<b>0.66 c</b>	<b>2.11 c</b>
<b>1</b>	<b>0.00 c</b>	<b>0.33 d</b>
<b>2</b>	<b>0.00 c</b>	<b>1.44 c</b>
<b>3</b>	<b>0.11 c</b>	<b>2.55 c</b>
<b>4</b>	<b>0.77 c</b>	<b>2.22 c</b>
<b>zea</b>		
<b>1</b>	<b>0.00 c</b>	<b>1.55 c</b>
<b>2</b>	<b>0.00 c</b>	<b>2.22 c</b>
<b>3</b>	<b>0.00 c</b>	<b>3.33 b</b>
<b>4</b>	<b>0.00 c</b>	<b>3.44 b</b>
<b>BA</b>		
<b>1</b>	<b>0.00 c</b>	<b>3.44 b</b>
<b>2</b>	<b>0.00 c</b>	<b>4.00 b</b>
<b>3</b>	<b>0.66 c</b>	<b>2.11 c</b>
<b>4</b>	<b>0.33 c</b>	<b>5.77 a</b>
<b>Kin</b>		
<b>1</b>	<b>0.66 c</b>	<b>2.44 c</b>
<b>2</b>	<b>0.11 c</b>	<b>2.55 c</b>
<b>3</b>	<b>2.55 b</b>	<b>3.55 b</b>
<b>4</b>	<b>3.00 a</b>	<b>2.88 b</b>

<sup>z</sup> Medias con la misma letra entre columnas son iguales estadísticamente (Tukey, P 0.05).

NOMBRE	MARCA	FORMULA	# CATALOGO	PESO MOLECULAR	CANTIDAD
Acido clorhídrico	Merck	C(HCl)=1mol/1(1N)	1.09057		1000 ml.
Acido bórico	Sigma	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	B-0252	FW 61.83 Mol.	1 Kg.
Acido nicotínico	Merck	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Art. 6817	Gew.123.11	25 gr.
Bencilaminopurina	Sigma		B-6750	225.2	5 gr.
Cloruro de calcio	Sigma	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	c-2536	FW 147.0	500 gr.
Cloruro de cobalto	Sigma	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	c-2911	FW 237.9	100 gr.
EDTA	Merck	C <sub>10</sub> HN <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	art.8418	372.24	500 gr.
Fosfato de potasio	J:T: Baker	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3246-01	PM 136.09	500 gr.
Glicina	Merck	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	1.04201.0100	M=75.07	100 gr.
Hidróxido	Merck	Na	1.06498.0500		40 gr.
Ioduro de potasio	Sigma	KI	P-5686	FW 166.0	100 gr.
Kinetina	Phyto technology	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NSO	K 750		5 mg.
Mio-inositol	Sigma	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	ene-11	FW 180.2	100gr.
Molibdato de sodio	Merck	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.06521	M 241,95 FW/PM	100 gr.
Nitrato de amonio	Caledon	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	C-1460-1	80.04	500 gr.
Nitrato de potasio	High Purity	KNO <sub>3</sub>	N. 1150	P.M. 101.10	500 gr.
Piridoxina	sigma	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> .HCl	P-8666	FW 205.6	25 gr.
Sulfato de cinc	Merck	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	888.3	287.54 g/mol	1 Kg.
Sulfato cúprico	sigma	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	c-3036	FW 249.7	250 gr.
Sulfato ferroso	J.T.Baker	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2070-05	pm 278.02	2.5 kg.
Sulfato manganoso	Merck	MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1.05941.0250	M 169.02	250 gr.
Sulfato de manganesio	sigma	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	M-7774	FW 246.5 M 337,27	1 Kg.
Tiamina	Merck Phyto technology	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>12</sub> N <sub>4</sub> OS.XH <sub>2</sub> O	108,181	g/mol	25 gr.
Thidiazuron	Phyto technology	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	T888	FW 220.2	100 gr.
Zeatina	technology	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O	z 125	FW 219.25	50 gr.
Zip	sigma	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub>	D5912	203.2	1 gr.