

Comparación de las fases de germinación de suspensiones celulares embriogénicas y desarrollo de plántulas de dos cultivares de *Musa*, en medio de cultivo semi-sólido y en inmersión temporal

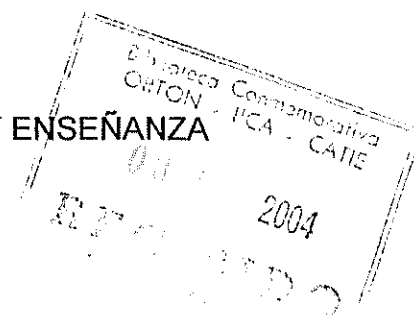
**PAOLA MARÍA SOLERA STELLER**

---

1102

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

CATIE



Programa de enseñanza para el desarrollo y la conservación Escuela de  
Posgraduados

**COMPARACIÓN DE LAS FASES DE GERMINACIÓN DE  
SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS Y DESARROLLO  
DE PLANTULAS DE DOS CULTIVARES DE *Musa*, EN MEDIO DE  
CULTIVO SEMI-SÓLIDO Y EN INMERSIÓN TEMPORAL**

Maestría de Agricultura Ecológica con énfasis en Recursos Fitogenéticos y  
Biotecnología

Tesis para optar por el grado de *Magister Scientiae*

Paola María Solera Steller

Turrialba, Costa Rica

2003

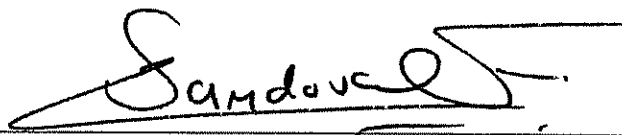
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

**MAGISTER SCIENTIAE**

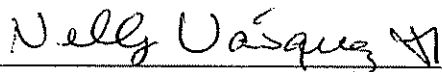
**FIRMANTES:**



\_\_\_\_\_  
María Elena Aguilar Vega, Ph.D.  
**Consejero Principal.**



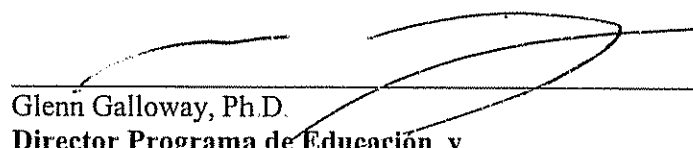
\_\_\_\_\_  
Jorge A. Sandoval, Ph.D.  
**Miembro Comité Consejero**




\_\_\_\_\_  
Nelly Vásquez, M.Sc.  
**Miembro Comité Consejero**



\_\_\_\_\_  
Juan Luis Ortiz, M.Sc.  
**Miembro Comité Consejero**



\_\_\_\_\_  
Glenn Galloway, Ph.D.  
**Director Programa de Educación y  
Decano de la Escuela de Posgrado**



\_\_\_\_\_  
Paola María Solera Steller  
**Candidata**

Gracias Dios por cada mañana,  
... para poder seguir andando

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi madre Elizabeth Steller P. y a mi hermana Angélica Solera S. por todo su apoyo y amor durante estos dos años, para que yo pudiera mejorar como profesional y como persona.

Agradezco a mi tutora, Dra. María Elena Aguilar V. por su ayuda, comprensión, conocimientos y guía, que sin duda significó un elemento imprescindible para realizar este trabajo

Agradezco al MSc. Juan Luis Ortiz V. por su ayuda, tiempo, comprensión, conocimientos y aliento durante todo el proceso de este trabajo, definitivamente el otro elemento indispensable para su realización.

Agradezco a la MSc. Nelly Vásquez por su apoyo, ayuda y observaciones en este trabajo. Así como al Dr. Jorge A. Sandoval por sus acertadas correcciones.

Agradezco al personal de la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), por su invaluable y desinteresada ayuda.

Agradezco a mis amigos del alma Andrés, Evelyn, Esteban, Lina, Mario, Mónica, Pilar, Yessenia, por que juntos formamos una familia en CATIE, donde cabíamos todos con nuestros matices y silencios... gracias por estar ahí.

También a mis compañeros Neidy, Alex, Jaime, Raul, Yady, Yadid y Sonia, que fueron parte de este proceso de mi vida y siempre estarán muy cerca de mi corazón ... gracias.

También agradezco al Consejo Nacional para Investigación Científicas y Tecnológicas (CONICIT), por su apoyo para la realización de esta investigación.

Por último, agradezco a todo el personal de CATIE, por toda su atención y amistad en estos dos años.

# ÍNDICE

Tema	página
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. JUSTIFICACIÓN .....	3
1.2. OBJETIVOS .....	5
1.2.1 Objetivo General .....	5
1.2.1 Objetivos Específicos .....	5
1.3. HIPÓTESIS .....	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	6
2.1. GENERALIDADES DEL CULTIVO .....	6
2.1.1 Origen y evolución .....	6
2.1.2. Historia y distribución .....	7
2.2. BOTÁNICA .....	7
2.2.1. Taxonomía .....	7
2.2.2 Morfología .....	9
2.2.3. Cultivares de estudio .....	10
2.3. MEJORAMIENTO GENÉTICO de <i>Musa</i> .....	11
2.4. BIOTECNOLOGÍA de <i>Musa</i> .....	12
2.4.1. Generalidades .....	12
2.4.2. Embriogénesis somática en <i>Musa</i> .....	14
2.4.3. Ontogenia de Embriogénesis somática .....	15
i. Inducción de la Embriogénesis somática .....	15
ii. Des-diferenciación y re-diferenciación del tejido .....	16
iii. Maduración .....	16
iv. Germinación .....	17
2.4.4. Cultivo en medio líquido .....	18
i. Suspensiones Celulares Embriogénicas .....	18
ii. Inmersión Temporal .....	20
iii. Recipientes de Inmersión temporal .....	22
2.5 ACLIMATACIÓN .....	24
2.6 COSTOS DE PRODUCCIÓN .....	24
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	26
3.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO .....	26
3.2. MATERIAL EXPERIMENTAL .....	26
3.2.1. Material Vegetal .....	26
3.2.2. Recipientes de Cultivo .....	26
3.2.3. Medios de Cultivo .....	26
3.2.4. Condiciones del Cultivo .....	27
3.3. METODOLOGÍA .....	27
3.3.1 Manejo de las suspensiones celulares embriogénicas .....	27
3.3.2. Multiplicación de las SCE .....	27
3.3.3. Regeneración de las SCE .....	28
3.3.4. Estudio de la fase de germinación de los embriones .....	28
3.3.5. Estudio de la fase de desarrollo de las plántulas .....	29
3.3.6. Estudio de las plantas en la fase de aclimatación .....	30
3.3.7. Histología de las hojas de las plantas desarrolladas .....	31
3.4. ANÁLISIS FINANCIERO .....	31
3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS .....	32

Tema	página
3.5.1. Variables estudiadas .....	32
i. Cantidad de biomasa .....	32
ii. Calidad de embriones obtenidos .....	33
3.5.2. Modelo Matemático .....	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	35
4.1 FASE DE MULTIPLICACIÓN DE LAS SCE .....	35
4.1.1. Tasa de multiplicación de las SCE .....	35
4.1.2. Calidad de las SCE .....	36
4.2. FASE DE REGENERACIÓN DE LAS SCE .....	41
4.3. FASE DE GERMINACIÓN DE LAS SCE.....	45
4.4. FASE DE DESARROLLO .....	54
4.5 FASE DE ACLIMATACIÓN .....	75
4.6 ANÁLISIS FINANCIERO .....	86
5. CONCLUSIONES .....	92
6. RECOMENDACIONES .....	94
7. BIBLIOGRAFÍA .....	95
8. ANEXOS .....	102
8.1 Anexo 1 .....	103
8.2 Anexo 2 .....	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>página</b>
Figura 1. Producción de bananos y de plátanos en el 2002 por continente, según la FAO .....	1
Figura 2. Curva de crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de los cv. 'Curraré' y 'Dátil', durante 36 días de evaluación .....	36
Figura 3. a. SCE del cv. 'Curraré' (10x) mostrando células libre (cl) con almidón hidrolizable y proteínas (ahp) y agregados celulares conteniendo células con almidón hidrolizable y proteínas (ahp). b. SCE del cv. 'Curraré' (25x) indicando agregados celulares (ac) grandes pequeños. Se notan algunas células diferenciadas. c. SCE del cv. 'Dátil' (10x) mostrando agregados celulares (ac) con contenido de almidón no hidrolizable (anh) y otras secciones de los agregados celulares con almidón hidrolizable y proteínas (ahp). d. SCE del cv. 'Dátil' (25x) mostrando agregados celulares con células vacías (acv) .....	37
Figura 4. Distribución de los promedios para los diferentes tipos celulares presentes en la SCE del cv. 'Curraré', durante cuatro semanas de evaluación en la fase de multiplicación ...	38
Figura 5. Distribución de los promedios para los diferentes tipos celulares presentes en la SCE del cv. 'Dátil', durante cuatro semanas de evaluación en la fase de multiplicación .....	40
Figura 6. Porcentajes de embriones somáticos en estado globular y con muesca bien formada, en los cvs. 'Curraré' y 'Dátil', después de diez semanas en la fase de regeneración.....	41
Figura 7. Evolución de la SCE del cv. 'Curraré', durante la fase de regeneración. a. SCE con 22 días de regeneración, mostrando agregados celulares necrotizados (acn). b. SCE a los 45 días, mostrando embriones con desarrollo tempranos (et). c. SCE a los 60 días, mostrando embriones desarrollados (ed). d. Embriones con dos meses y medio de desarrollo, con su muesca bien formada (emf) .....	42
Figura 8. Evolución de la SCE del cv. 'Dátil', durante la fase de regeneración. a. SCE con 22 días de regeneración, mostrando una masa gelatinosa de coloración naranja (mg). b. SCE a los 45 días, mostrando embriones en desarrollo temprano (et). c. SCE a los 60 días, mostrando embriones desarrollados (ed). d. Embriones con dos meses y medio de desarrollo, con su muesca bien formada (emf) .....	43
Figura 9. Promedios del peso fresco (PF), en gramos, de los embriones de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' en la fase de germinación bajo cultivo en dos recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA®) y del tratamiento testigo en medio de cultivo semi-sólido, para tres inóculos diferentes (0.5, 1.0 y 1.5 g) .....	45
Figura 10. Embriones somáticos de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' en fase de germinación. a. Embriones germinados del cv. 'Curraré' en medio semi-sólido. b. Embriones germinados del cv. 'Curraré' cultivados en recipiente RITA®. c. Embriones germinados del cv. 'Dátil', en medio semi-sólido. d. Embriones germinados del cv. 'Dátil' en el recipiente RITA® .....	46
Figura 11. Embriones somáticos de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil', con un mes en germinación en inmersión temporal. a. Embriones del cv. 'Curraré' cultivados en RITA®. b. Embriones del cv. 'Curraré' en Nalgen®. c. Embriones del cv. 'Dátil' cultivados en RITA®. d. Embriones del cv. 'Dátil' en Nalgen® (d) .....	47



<b>Figura</b>	<b>página</b>
Figura 12. Porcentajes del promedio de peso fresco (PF), en gramos, para la fase de desarrollo de los cultivares 'Curraré' y 'Dátil' en los recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA®) y el testigo (semi-sólido) con los inóculos de 0.5, 1.0 y 1.5 g .....	54
Figura 13. Plántulas de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' después de dos meses y medio de cultivo en inmersión temporal en la fase de desarrollo. <b>a.</b> Plántulas del cv. 'Curraré' en Nalgen®. <b>b.</b> Plántulas del cv. 'Curraré' en RITA®. <b>c.</b> Plántulas del cv. 'Dátil' Nalgen®. <b>d.</b> Plántulas del cv. 'Dátil' en RITA® .....	56
Figura 14. Cultivos del tratamiento testigo de los cv. 'Curraré' y 'Dátil' en medio semi-sólido, durante la fase de desarrollo. <b>a.</b> Plántulas del cv. 'Curraré', mostrando un crecimiento normal. <b>b.</b> Cultivo de 'Dátil', mostrando un desarrollo anormal con la regresión a la callogénesis de los embriones .....	58
Figura 15. Número promedio de EG, ENG y EE del cv. 'Curraré' en la fase de desarrollo, cultivados en inmersión temporal, bajo tres densidades de siembra (0.5, 1.0 y 1.5 g). <b>a.</b> Número de embriones en el recipiente Nalgen®. <b>b.</b> Número de embriones en el recipientes RITA® .....	59
Figura 16. Número promedio de EG, ENG y EE del cv. 'Curraré' en la fase de desarrollo, cultivados en inmersión temporal, bajo tres densidades de siembra (0.5, 1.0 y 1.5g). <b>a.</b> Número de embriones en el recipiente Nalgen®. <b>b.</b> Número de embriones en el recipientes RITA® .....	61
Figura17. Número de hojas ( <b>a</b> ), longitud, en centímetro, ( <b>b</b> ) peso fresco (PF) y peso seco (PS), en gramos ( <b>c</b> )y porcentaje de contenido de agua ( <b>d</b> ), para las plántulas evaluadas durante la fase de desarrollo de los cvs. 'Curraré' y 'Dáti', según los inóculos (0.5, 1.0 y 1.5 g) y los recipientes de inmersión usado (RITA® y Nalgen® de Nalgene), empleando un $\alpha < 0.05$ . No se tomo en cuenta el testigo .....	64
Figura 18. Porcentaje de plántulas con raíces presentes en los cultivares de 'Curraré' y Dátil' para los recipientes de inmersión temporal usado (RITA® y Nalgen®) con los inóculo de siembra (0.5, 1.0 y 1.5 g ) y el testigo en medio semi-sólido .....	65
Figura 19. Porcentaje de daños observados en las plántulas de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' durante la fase de desarrollo, en inmersión temporal (RITA® y Nalgen®) bajo tres densidades de inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 g). Se empleo un $\alpha < 0.05$ . No se tomo en cuenta el testigo .....	67
Figura 20. Plántulas del cv. 'Curraré', mostrando. <b>a.</b> El fenómeno de etiolación. <b>b.</b> El fenómeno combinado de etiolación y oxidación .....	68
Figura 21. Diferentes malformaciones encontradas de manera ocasional en los dos recipientes de inmersión temporal (RITA® y Nalgen®), para los dos cultivares de 'Curraré' y 'Dátil'. <b>a.</b> Plántula con callo. ( <b>c</b> ), <b>b.</b> Plántulas en macolla ( <b>m</b> ). <b>c.</b> Hojas filamentosas ( <b>hf</b> ). <b>d.</b> plántulas con raíces creciendo en pseudotallo ( <b>tr</b> ). <b>e.</b> Plántulas con malformaciones en las cuales se muestran conexiones de los haces vasculares entre plántulas con unión de radícula ( <b>ruh</b> ). <b>f.</b> Unión de pseudotallos ( <b>ruh</b> ) .....	70
Figura 22. Estructura de los callos formados en el tratamiento testigo del cv. 'Dátil', durante la fase de desarrollo. <b>a.</b> Formación de estructuras diferenciadas, las cuales parten de los agregados pero no forman ni meristemas, ni plántulas. <b>b.</b> Callos con regiones fotosintéticas <b>c.</b> y <b>d.</b> Estructuras semejantes a hojas, las cuales no se desarrollan .....	71

<b>Figura</b>	<b>página</b>
Figura 23. Corte transversal de un callo del cv. 'Dátil', generado durante la fase de desarrollo (25x). Se observan células parenquimatosas (cp) conteniendo estructuras que asemejan cúmulos de almidón (ea) .....	72
Figura 24. Porcentajes promedio de la hiperhidricidad observada en las plántulas de los cultivares de 'Curraré' y 'Dátil' cultivadas en los recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA®) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido con tres inóculos (0.5, 1.0 y 1.5 g) durante la fase de desarrollo .....	72
Figura 25. Plántulas de dos cultivares de <i>Musa</i> mostrando el fenómeno de hiperhidricidad. a Plántula del cv. 'Curraré' sana. b. Plántula del cv. 'Curraré' hiperhídrica. c. Plántula sana del cv. 'Dátil'. d. Plántula del cv. 'Dátil' mostrando hiperhidricidad .....	74
Figura 26. Evolución de las plántulas del cv. 'Curraré', durante la fase de aclimatación. a. Plántulas en el primer día de siembra. b. Plántulas a los ocho días de ser llevadas al invernadero. c. Plántulas a los 22 días de ser transferidas al invernadero. d. Plántulas con un mes de aclimatación .....	76
Figura 27. Promedios de la longitud (cm) de las plántulas obtenidas del cv. 'Curraré', en los recipientes de inmersión temporal (RITA® y Nalgen®) y el testigo en medio semi-sólido, durante cuatro semanas de cultivo en la fase de aclimatación .....	78
Figura 28. Promedios del número de hojas de las plántulas obtenidas del cv. 'Curraré', en los recipientes de inmersión temporal (RITA® y Nalgen®) y el testigo en medio semi-sólido, durante cuatro semanas de cultivo en la fase de aclimatación .....	80
Figura 29. Superficie abaxial de una hoja de plántulas del cv. 'Curraré', mostrando el detalle de un estoma (e) con las células oclusivas (co) que rodean al poro estomático (po). Aumento de 10x .....	81
Figura 30. Distribución del porcentaje de estomas presentes en hojas de plantas del cv. 'Curraré', cultivadas en los recipientes (Nalgen® y RITA®) y del testigo en medio de cultivo semi-sólido, según su posición .....	81
Figura 31. Número promedio de estomas observados en hojas de plántulas del cv. 'Curraré' de acuerdo a la posición (envés y haz), el tiempo de evaluación (día 1 y día 30) y el recipiente de inmersión usado (Nalgen® y RITA®) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido. Las letras pequeñas indican la significancia estadística, según la prueba de Duncan con un $\alpha$ de .001 .....	83
Figura 32. Estomas de plántulas del cv. 'Curraré'. a. Estomas en el haz de la hoja antes de la aclimatación (25x). b. Estomas en el envés de una hoja antes de ser llevados al invernadero (25x). c. Estomas del haz de una hoja después de 30 días de aclimatación (25x). d. Estomas del envés de la hoja de una planta aclimatada (25x) .....	84
Figura 33. Cortes transversales de hojas de plántulas del cv. 'Curraré', a. antes y b. después de un mes de aclimatación. Se observan células epidérmicas (ce) y subepidérmica (cse) en la superficie de la hoja. Para la parte interna se pueden ver diferencias en el desarrollo del mesófilo esponjoso (me) y el mesófilo en empalizada (mem). Además se observan cortes de estomas (e) y de su cámara estomática (ce). Aumento 25x .....	85

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	página
Cuadro 1. Significancias del peso fresco (PF) final, en gramos, de los diferentes tratamientos evaluados durante la fase de germinación para los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' en los recipientes (Nalgen® y RITA ©) para tres inóculos iniciales de cultivo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido. Se usó la prueba de Duncan con un $\alpha$ de 0.01 .....	48
Cuadro 2. Porcentajes promedio de embriones germinados (EG), embriones no germinados (ENG) y embriones emergidos (EE) para los cultivares 'Dátil' y 'Curraré' en los recipientes RITA®, Nalgen® con tres inóculos de cultivo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido, durante la fase de germinación .....	49
Cuadro 3. Significancias del número de embriones germinados, embriones no germinados y embriones emergidos de los cultivares de 'Curraré' y 'Dátil' en la fase de germinación. Se usó la prueba de Duncan con un $\alpha$ de 0.01. No se usó el testigo .....	50
Cuadro 4. Significancias del número de embriones germinados, embriones no germinados y embriones emergidos para los inóculos usados (0.5, 1.0 y 1.5 g) en la fase de germinación. Se usó la prueba de Duncan con un $\alpha$ de 0.01. No se usó el testigo .....	52
Cuadro 5. Número de plántulas estimado, número de plántulas obtenidas y el peso de las plántulas para los cultivares de 'Curraré' y 'Dátil', en los dos recipientes (Nalgen® y RITA®) y tres inóculos (0.5, 1.0 y 1.5 g) .....	55
Cuadro 6. Número de plántulas real obtenido y peso fresco (PF) promedio, en gramos, de una plántula para el tratamiento testigos del cv. 'Curraré', cultivado en medio semi-sólido .....	57
Cuadro 7. Significancias del número de embriones germinados (EG), embriones no germinados (ENG), embriones emergidos (EE) y plántulas del cv. 'Curraré', presentes en los tres estratos para cada recipiente y los inóculos usados (0.5, 1.0 y 1.5 g) en la fase de desarrollo. Se usó la prueba de Duncan con un $\alpha$ de 0.01. No se usó el testigo .....	60
Cuadro 8. Significancias del número de embriones germinados (EG), embriones no germinados (ENG), embriones emergidos (EE) y plántulas del cv. 'Dátil', presentes en los tres estratos y los inóculos usados (0.5, 1.0 y 1.5 g) en la fase de desarrollo. Se usó la prueba de Duncan con un $\alpha$ de 0.01. No se usó el testigo .....	62
Cuadro 9. Promedios de los porcentajes de sobrevivencia (%S) para las plántulas del cv. 'Curraré' obtenidos después de un mes de aclimatación, en los recipientes de inmersión temporal y el testigo, en medio de cultivo semi-sólido .....	75
Cuadro 10. Costos de producción de plántulas en los recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA®) y el testigo en medio semi-sólido, para un cultivar .....	87
Cuadro 11. Número de plántulas estimado, número de plántulas contabilizado y el peso de las plántulas para los cvs. de 'Curraré' y 'Dátil', para los dos recipientes usados (Nalgen® de Nalgene y RITA®) y tres inóculos (0.5, 1.0 y 1.5 g) .....	89

**Cuadro**

página

Cuadro 12. Relaciones de costo/beneficio (C/B) para los tratamientos de los cultivares 'Curraré' y 'Dátil' empleando los recipientes de inmersión temporal Nalgen® y RITA® y con tres inóculos de cultivo (0.5, 1.0 y 1.5 gr.) y los costos de producción por recipiente empleado .....

90

# ANEXOS

## Anexo 1

### Figura

página

Figura 1. Diagrama que indica el funcionamiento del recipiente para inmersión temporal RITA©. 1. Fase emergida. Los explantes están colocados sobre un disco de esponja de poliuretano. 2. Fase sumergida Una sobrepresión de aire estéril, aplicada en la parte baja, permite al medio de cultivo subir a la parte alta donde se encuentran los explantes. 3. El aire inyectado permite la oxigenación del medio. 4. El aire de la parte alta se renueva totalmente. 5. Pasado el tiempo de inmersión, la bomba de aire se apaga. Las presiones se equilibran, y el medio vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene en contacto sobre los explantes. (fuente <a href="http://cirad.fr/produit/Rita">cirad.fr/produit/Rita</a> ) .....	103
Figura 2. Diagrama que muestra el funcionamiento de la unidad de filtrado Nalgene, Nalge®, modificado para inmersión temporal de células en suspensión. El medio de cultivo sube al compartimento superior (a.). Se aplica una fuerza de presión sobre la solución en el compartimento superior del recipiente y los explantes son cubiertos por el medio (b. y c.). Cuando la presión es liberada, el flujo del medio regresa al compartimento inferior (d.). El uso de una válvula solenoide en el circuito acelerado de aire permite el regreso del medio al compartimento inferior. 1- bomba de aire; 2- válvula solenoide, 3- filtro de 22µ, 4- tubo conectivo del compartimento inferior con el superior, 5- compartimento superior con los explantes .....	104
Cuadro 1. Tratamientos aplicados a dos cultivares de <i>Musa</i> , 'Curraré' y 'Dátil', empleando dos recipientes de inmersión temporal (Nalge® y RITA©), con tres inóculos de siembra (0.5, 1.0, 1.5 g) y un testigo en medio semi-sólido. Se aplicaron tres repeticiones por tratamiento. El modelo matemático que se usó fue un factorial 3(2x3x3), con algunas variantes .....	105
Cuadro 2. Componentes de los diferentes medios de cultivos, propuestos por Ma (1991) para la regeneración de <i>Musa</i> . .....	106

## Anexo 2

### Cuadro

página

Cuadro 1. Valores de la F para la varianza realizada al peso fresco (PF), en gramos, de los recipientes usados (RITA© y Nalgen®) y el testigo en medio semi-sólido, para los cvs. 'Curraré' y 'Dátil', durante la fase de germinación y con un $\alpha$ de $\alpha 0.01$ .....	107
Cuadro 2. Valores F de las varianzas realizadas para el número de embriones germinados (EG), embriones no germinados (ENG) y embriones emergidos (EE) de los cvs. 'Dátil' y 'Curraré', según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y los recipientes de inmersión usado (RITA© y Nalgen®), empleando un $\alpha$ de 0.01. No se tomo en cuenta el testigo. ....	107
Cuadro 3. Valores F de las varianzas realizadas para peso fresco (PF) final de la fase de desarrollo de los cultivares 'Curraré' y 'Dátil', según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y el recipiente de inmersión usado (RITA© y Nalgen®), empleando un $\alpha < 0.01$ . No se tomo en cuenta el testigo .....	107
Cuadro 4. Valores F de las varianzas realizadas para el número de embriones germinados, embriones no germinados y embriones emergidos de el cv. 'Curraré' durante la fase de desarrollo, según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y el recipiente de inmersión usado (RITA© y Nalgen® ), empleando un $\alpha$ de 0.01. No se tomo en cuenta el testigo.....	108
Cuadro 5. Valores F de las varianzas realizadas para el número de embriones germinados, embriones no germinados, embriones emergidos y plántulas del cv. 'Dátil' durante la fase de desarrollo, según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 gr) y el recipiente de inmersión usado (Nalgen® y RITA©), empleando un $\alpha < 0.05$ . No se tomo en cuenta el testigo .....	108
Cuadro 6. Valores F de las varianzas realizadas del número de hojas por plántula de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' durante la fase de desarrollo, según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 gr) y el recipiente de inmersión usado (RITA© y Nalgen® de Nalgene), empleando un $\alpha$ 0.01. No se tomo en cuenta el testigo .....	108
Cuadro 7. Valores F de las varianzas de la presencia o ausencia de raíces en las plántulas del los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' durante la fase de desarrollo, según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 gr) y el recipiente de inmersión usado (RITA© y Nalgen® de Nalgene), empleando un $\alpha < 0.01$ . No se tomo en cuenta el testigo .....	109
Figura 1. Significancia de los porcentajes de sobrevivencia para las plántulas del cv 'Curraré' cultivadas en los recipientes de inmersión temporal Nalgen® y RITA© y el testigo en medio de cultivo semi-sólido con una densidad de siembra de 0.5 gr., aclimatadas por un mes. Las barras indican la desviación estándar y las letras indican las diferencias significativas para la prueba Duncan. Se usó un $\alpha$ de 0 01 .....	109
Cuadro 8. Significancia de los promedios de la longitud (cm) y del número de hojas de las plántulas del cv 'Curraré' derivadas del inóculo de 0,5g, en los recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA©) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido. Se usó la prueba de Duncan con un $\alpha$ 0.01 .....	110

<b>Cuadro</b>	<b>página</b>
Cuadro 9. Valores de la F para la varianza realizada al incremento del número de hojas presentes en las plántulas del cv 'Curraré' de los recipientes usados (RITA© y Nalgene©) y el testigo en medio semi-sólido, durante la fase de germinación y con un $\alpha$ de <0.01. ....	110
Cuadro 10. Valores de la F para la varianza realizada a los estomas presentes en las plántulas del cv 'Curraré' según la posición de la hoja (haz y envés) para dos momentos diferentes (antes y después de la aclimatación) y usando los recipientes (RITA© y Nalgen© de Nalgene) y el testigo en medio semi-sólido. Se utilizó un $\alpha$ de <0.01 .....	110

**Solera, PM. 2003.** Comparación de las fases de germinación de suspensiones celulares embriogénicas y desarrollo de plántulas en medio de cultivo semi-sólido y en inmersión temporal, de dos cultivares de *musa* (AA, AAB)

**Palabras clave:** Bananos, plátanos, cv. 'Curraré', cv. 'Dátil', suspensiones celulares embriogénicas (SCE), bioreactores de inmersión temporal, Nalgen®, RITA®, inóculo de siembra, porcentaje de germinación, porcentaje de aclimatación, calidad de desarrollo, competencia.

La optimización de la embriogénesis somática de musáceas en todos sus aspectos, es una prioridad para que esta técnica pueda ser utilizada de manera confiable como estrategia para la multiplicación clonal y el mejoramiento genético convencional. Este trabajo pretende contribuir con este proceso mediante la comparación de las fases de germinación de embriones, desarrollo y aclimatación de plantas de dos cultivares de *Musa* sp. ('Curraré' AAB y 'Dátil' AA) en bioreactores de inmersión temporal (RITA © y Nalgen®) y en medio semi-sólido. Se trabajó con SCE de diez meses, previamente tamizadas y regeneradas en medio semi-sólido. Las variables de estudio fueron la densidad de inóculo (0.5, 1.0 y 1.5g), la cantidad y desarrollo de los embriones y plántulas y las interacción que surgieron entre ellos y su ambiente. Los resultados muestran una germinación de 59.51% en el RITA©, para una densidad de inóculo de 0.5g, en el cv. 'Curraré'; mientras en el Nalgen® la germinación fue del 28.69%, bajo las mismas condiciones. No obstante, en la fase de desarrollo la cantidad y calidad de las plantas obtenidas fue mayor en Nalgen® (369), que en RITA© (296), usando el mismo inóculo (0.5g). Comparativamente, los resultados obtenidos en el cv. 'Dátil' fueron muy pobres, lo cual se debe posiblemente a que las SCE de este cultivar requieren de mayor tiempo durante la fase de regeneración; además puede estar relacionado a los procesos de regeneración de los embriones. Así mismo, las plantas de 'Curraré' mostraron excelentes condiciones para una rápida aclimatación al ambiente *ex vitro*, con porcentajes de sobrevivencia entre el 80 y 85%. A pesar de que son necesarios más estudios para ajustar de manera óptima el sistema, con el uso de suspensiones celulares embriogénicas (SCE) en inmersión temporal se ha logrado amplificar y favorecer la sincronía de la embriogénesis somática, mejorando la densidad y la calidad de los embriones y plantas obtenidas; así como disminuir los tiempos y costos de producción.



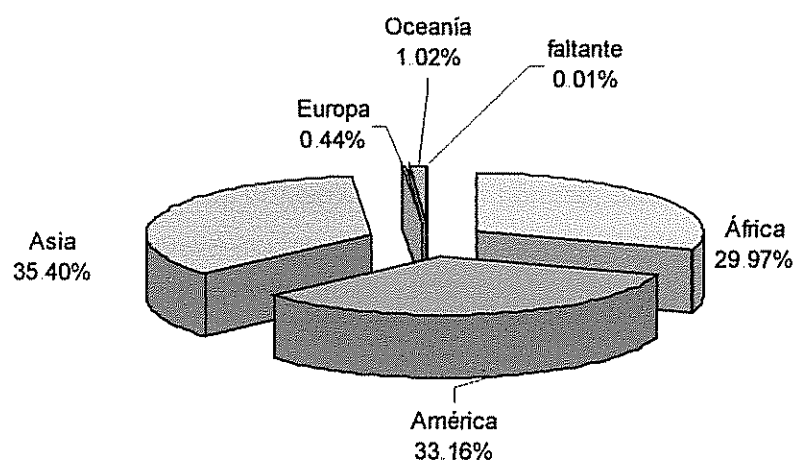
**Solera, PM. 2003.** Comparisons of germination phase embryogenic cellular suspensions and plantlet development of two cultivars of *Musa sp.*, in semisolid media and temporary immersion bioreactors.

**Key words:** Plantain, banana, cultivar 'Curraré', cultivar 'Dátil', embriogénics cellulars suspensions (ECS), temporary immersion bioreactor (TIB), Nalgen®, RITA®, inoculum of sowing, germination rate , quality development, fitness.

The optimization of somatic embryogenesis protocols of musáceas is a priority as it can be used as a reliable method of clonal multiplication. In this study we are comparing the effects of semisolid media in petri dishes and the condition of two temporary immersion bioreactors (RITA © and Nalgen®) on *in vitro* regeneration of *Musa* cultivars 'Curraré' (AAB) and 'Dátil' (AA). In a attempt to optimize *in vitro* regeneration in these two *Musa* cultivars, the effects of method of propagation on growth rate, quantity, quality and ability plants of regenerated to acclimatize in the *in vitro* environment were assessed. The study variables were the density of inoculum (0.5, 1. 0 and 1.5g), amount and development of embryos and plantlet, and the interactions arising among them and their atmosphere. The results show a germination rate of 59.5% in the RITA®, for a density of inoculum of 0.5g, with cultivar 'Curraré'; while in the Nalgen® the rate of germination was only 28.7%, under the same growth conditions. However, in the phase of cell differentiation the amount and quality of plants obtained were better in Nalgen® (369), than in RITA® (296), using the same inoculum (0.5g). Conversely, the results obtained with cultivar 'Dátil' were very poor. This possibly indicates that SCE of this cultivar requires more time during the regeneration phase. In addition, it can be related to the processes of embryo regeneration. Also, 'Curraré' plants acclimatized readily to the *ex vitro* environment, with a fitness rate between 80 and 85%. Although more studies are necessary to find the optimal system, the use of embriogénic cellular suspensions (ECS) in temporary immersion bioreactors has enabled amplification and favored the synchrony of somatic embryogenesis, improving the density and quality of embryos and plants; as well as diminish time and production costs.

## 1 INTRODUCCIÓN

Los bananos y los plátanos son cultivos producidos en 120 países en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, donde constituyen un aporte importante a la alimentación de casi 500 millones de personas; así como su comercio provee un recurso de alto valor económico en los mercados locales e internacionales. Para el 2002, se indicó que estos cultivos están sembrados en un área aproximada de 10,5 millones de hectáreas, con una producción anual de cerca de 102 millones de toneladas métricas por hectárea (Figura 1.), mostrando una disminución en las exportaciones de Asia y un aumento del 3,4% en América Latina. En el área del América Central y el Caribe se produce el 10.77% de la producción mundial de bananos y plátanos (FAO 2002b).



FTE © Copyright FAO 1990-2002

Figura 1. Producción de bananos y plátanos en el 2002, por continente, según la FAO.

Estas Musáceas constituyen el cuarto cultivo alimenticio más importante del mundo, después del arroz, el trigo, y el maíz (FAO 2002b). Los bananos y plátanos proporcionan más de un cuarto de todas las calorías del alimento en algunos pueblos; además de aportar vitaminas A, C, y B<sub>6</sub> y altos niveles de calcio, potasio, y fósforo, proporcionando una fuente esencial de la nutrición en países en vías de desarrollo (Smith *et al.* 1992; INIBAP 1997).

Sin embargo, su producción se ve afectada cada día, debido a enfermedades tropicales como es el caso de la "Sigatoka negra" (*Mycosphaerella fijiensis*) y el "Mal de Panamá"

(*Fusarium oxysporum*) (Dadzie y Orchard 1997); así como los virus del "bunchy top" (BBTV) y del rayado del banano (BSV) (Gómez-Kosky *et al.* 2000); los cuales aumentan los costos de producción y disminuyen la economía del pequeño productor de las zonas rurales. Las prácticas agronómicas son insuficientes para el control de dichas enfermedades, por lo que el mejoramiento genético se convierte en un arma esencial para generar variedades con mayor resistencia (Smith *et al.* 1992).

Frente a la necesidad actual de generar estrategias alternativas y diversificadas para los productores agrícolas de América Latina y África, se ha estimulado la investigación por parte de organizaciones gubernamentales, internacionales y ONGs. Esto con el fin de promover el uso de tecnología de punta que permita, a los agricultores de los países en vías de desarrollo, cultivar bananos con resistencia al ataque de enfermedades y plagas; así como cultivares de alto rendimiento y valor alimenticio (Picq *et al.* 1999).

Sin embargo, los bananos y plátanos son cultivos difíciles de mejorar genéticamente, debido a que la mayoría de las variedades económicamente importantes tienen flores femeninas con baja fertilización y presentan alta poliploidía (Grapin *et al.* 2000); además, generalmente los rizomas están contaminados con hongos, bacterias, virus y nemátodos (Molina 1989). Esto promueve opciones de investigación dirigidas hacia el desarrollo de biotecnologías apropiadas que generen un mejoramiento más eficiente, directo y rápido de los cultivares de *Musa* (Grapin *et al.* 1998). Debido a esto, las técnicas de regeneración *in vitro* juegan un papel preponderante dentro de la carrera por proporcionar soluciones a los problemas fitosanitarios y al aumento en la productividad de las especies comerciales de este género (Castro *et al.* 2002).

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática ha demostrado ser un método eficiente, debido a su alto potencial de multiplicación y a la amplia posibilidad de propagación de clones élite a gran escala (Etienne *et al.* 1999). Además, con el uso de suspensiones celulares embriogénicas de tejidos foliares, meristemas altamente proliferantes, rizomas y recientemente a través de flores masculinas y femeninas de *Musa* (Grapin *et al.* 1998; Grapin *et al.* 2000) se puede lograr la automatización (Etienne *et al.* 1997), ya que es posible obtener plantas completas similares a la donante (Pérez *et al.* 1999) y se abre la posibilidad de aprovechar estas técnicas en beneficio del mejoramiento genético.

Con el uso de la metodología de bioreactores de inmersión temporal se ha logrado amplificar el fenómeno de embriogénesis somática (Escalant *et al.* 1994b), ya que mejora la densidad de embriones obtenidos y genera un paso significativo para la producción de plantas a gran escala (Pérez *et al.* 2000), disminuyendo el tiempo y los costos de producción (Feria *et al.* 2000). Sin embargo, es importante establecer y optimizar las densidades de inóculo y tiempos de inmersión, que establezcan las mejores condiciones para las fases de germinación y desarrollo de los mismos (Gómez-Kosky *et al.* 2000). Para esto es necesario la valoración de los diferentes recipientes utilizados para inmersión temporal; tales como el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizado (RITA©) y el Nalgen® de Nalgene.

## 1.1 JUSTIFICACIÓN

Las necesidades de la región en cuanto a la producción de banano y plátano de alta calidad y con resistencia a diferentes enfermedades, han estimulado la producción a gran escala de material mejorado. El uso de técnicas de micropropagación garantiza la inocuidad del material y además acelera el proceso de producción. La embriogénesis somática es una de las técnicas de micropropagación que permite una rápida propagación masal de plantas mejoradas convencionalmente o por transformación genética de células somáticas. Sin embargo, los problemas que se presentan durante las fases de regeneración, germinación y aclimatación de los embriones somáticos han limitado la aplicación de la técnica de manera extensiva. Debido a esta problemática se han incentivado nuevas investigaciones para mejorar estos métodos de micropropagación.

El uso de suspensiones celulares embriogénicas en *Musa*, con alto potencial de regeneración representa una alternativa bien justificada para la micropropagación a gran escala de clones élite, ya que este sistema permite potencializar el estado morfogénico del material. De esta manera se genera un alto número de embriones de calidad, o bien producidos en los programas de mejoramiento genético. No obstante, aunque el uso de suspensiones celulares embriogénicas en *Musa* ha sido ampliamente estudiado todavía faltan muchos aspectos por resolver y optimizar por los equipos de investigación en los diferentes países.

La técnica de inmersión temporal brinda un aporte substancial para la micropropagación, ya que logra amplificar el proceso embriogénico, partiendo del conocimiento de la dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares embriogénicas. Además, permite un manejo más eficiente del ambiente *in vitro* en las fases de germinación de los embriones y desarrollo de las plántulas; logrando así optimizar y automatizar el sistema. Las técnicas de cultivo *in vitro* en medios semi-sólidos presentan importantes limitaciones, lo cual ha favorecido el uso de sistemas de inmersión temporal automática (RITA®), ya que permite mayor control del microambiente, mejor disponibilidad y distribución de los nutrientes, disminución de los problemas de asfixia e hiperhidricidad, a la vez que simplifican y automatizan parcialmente el proceso de cultivo *in vitro* (Alvard *et al.* 1993).

Desde el punto de vista del proceso de producción de vitroplantas, las técnicas de inmersión temporal reducen los costos de manipulación al disminuir la frecuencia de los subcultivos, además del gasto asociado a la elaboración de los medios de cultivo y el uso de gelificantes como el agar, que encarecen las prácticas de micropropagación (Etienne y Berthouly 2002). También disminuye el espacio necesario para el proceso de regeneración, ya que en el mismo recipiente se pueden realizar varias fases de cultivo con sólo hacer un cambio de medio. Además, se obtienen plántulas mejor adaptadas a las condiciones *ex vitro*, favoreciendo la transferencia directa de las mismas a la fase de aclimatación en invernadero.

En este sentido, es determinante evaluar la eficiencia y estabilidad de los diferentes recipientes para inmersión temporal (RITA®, Nalgen®, stirred tank) para así establecer cual ofrece las mejores condiciones durante la germinación de embriones y el desarrollo de plántulas de banano y plátano. En estos cultivos los estudios realizados hasta el momento son pocos y aún no se ha logrado definir todos los factores que operan en cada sistema, por lo cual es preponderante realizar estudios al respecto.

No obstante, se ha determinado que la densidad de inóculo es uno de los factores limitantes de la inmersión temporal de suspensiones celulares, por lo que es de necesidad prioritaria determinar esta condición, para así establecer mejoras en la técnica en términos de eficiencia para la producción y estabilidad del sistema. De igual manera, valorar la técnica en los diferentes cultivares aporta información acerca de las individualidades de cada cultivar y sus procesos de regeneración, germinación y comportamiento en la aclimatación.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo General**

Evaluar las fases de germinación de embriones somáticos, desarrollo y aclimatación de plantas de dos cultivares de *Musa* ('Curraré' AAB; 'Dátil' AA), en medio de cultivo semi-sólido y en inmersión temporal.

### **1.2.2 Objetivos específicos**

- Determinar la densidad óptima del inóculo en gramos, para iniciar la fase de germinación de embriones somáticos de dos cultivares de *Musa*, mediante inmersión temporal en los recipientes RITA© y Nalgen® de Nalgene.
- Estudiar el efecto de los tres sistemas de cultivo en cuanto al rendimiento, en términos de germinación y desarrollo de la embriogénesis somática de los cultivares 'Curraré' (AAB) y 'Dátil' (AA).
- Comparar el éxito del establecimiento de las plantas obtenidas en la fase de aclimatación para los diferentes tratamientos.

## **1.3 HIPÓTESIS**

- Existen diferencias significativas entre los dos sistemas de cultivo evaluados para las fases de germinación y desarrollo de suspensiones celulares embriogénicas.
- Los dos cultivares evaluados presentan similitud en la respuesta a los métodos usados (medio de cultivo semi-sólido, RITA© y Nalgen® de Nalgene).
- La densidad del inóculo es un factor limitante para el establecimiento del cultivo en un sistema de inmersión temporal en los cultivares de plátano y banano.
- El éxito de la aclimatación es similar para todos los tratamientos evaluados.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 GENERALIDADES DEL CULTIVO

#### 2.1.1 Origen y evolución

Los plátanos y bananos evolucionaron en el sudoeste asiático, sin embargo la ubicación exacta no está clara (Soto 1992; Smith *et al.* 1992). Su cultivo se desarrolló simultáneamente en Malasia y en las Islas Indonesias (Soto 1992) y se ha considerado a la India y Filipinas como subcentros activos de domesticación (León 2000).

La mayoría de los cultivares de banano y plátano, pertenecen a la sección EUMUSA, la cual tiene su origen en la región indomalaya (Daniells *et al.* 2001). Es en esta zona donde se encuentran aún muchos tipos silvestres y, debido a las condiciones primitivas del cultivo, se conservan todavía numerosas variantes de la especie (León 2000). En el centro de esta región predominan los tipos *M. acuminata* (AA), que están mejor adaptados a las zonas de alta humedad (Smith *et al.* 1992), mientras que en la periferia, en la India, son más comunes los híbridos triploides con *M. balbisiana* (AAB y ABB) debido a que crecen mejor en zonas más secas (León 2000).

Existen otros dos centros de origen secundarios fuera del Sudeste de Asia, que presentan una importante diversidad, uno se localiza en África Occidental y Central y el otro en los Altiplanos de África Oriental. Ambas regiones muestran variedades raras en relación con la zona Asiática y su origen aún no ha sido dilucidado (INIBAP 2001).

La evolución de los bananos cultivados está muy ligada a factores decisivos como la poliploidía, esterilidad y partenocarpia (León 2000). Este proceso se explica partiendo de diploides androfértiles de *M. acuminata*, con frutos comestibles sin semilla, que fueron hibridizados espontáneamente con *M. balbisiana*; generando la subsiguiente formación de tipos poliploides (Smith *et al.* 1992). La selección por el hombre debió poseer un factor causal; ya que ésta área es uno de los centros en donde el hombre ha aprovechado más las plantas silvestres, sin establecer un desarrollo de una gran cultura agrícola; por lo tanto, es posible que la acción humana se redujera a propagar clones superiores, por su tamaño y sabor (León 2000). La propagación vegetativa, unida a la interacción de esterilidad-poliploidía-partenocarpia, deja como fuente de variación a las mutaciones

somáticas, las cuales son el origen de muchos de los cultivares de bananos y plátanos actuales (León 2000).

### **2.1.2 Historia y distribución**

El cultivo del banano se ha documentado en diferentes culturas y se le reconoce como uno de los alimentos usados por el hombre durante miles de años (Soto 1992). Se cree que los clones presentes en África fueron introducidos por los árabes, a través de las vías India-Golfo Pérsico-Arabia-África Oriental (Soto 1992; León 2000) o Indonesia-Madagascar-África Oriental (Smith *et al.* 1992; León 2000), a partir de los cuales se extendieron por el resto de África. Es posible que los clones establecidos en Las Canarias, y después en América, vinieran de Guinea en África Occidental (León 2000).

Los bananos y plátanos fueron introducidos a América después de la conquista por Fray Tomás de Berlanga en 1516 (Soto 1992; Smith *et al.* 1992), donde se estableció de manera inmediata en la alimentación de los nativos, logrando una dispersión rápida del cultivo (León 2000). Su rápida difusión se debió en gran medida a las condiciones del fruto (León 2000) y a las condiciones ambientales y edafológicas de la zona (Smith *et al.* 1992)

El cultivo del banano en el trópico americano para la exportación a Estados Unidos y a Europa ha sido mucho más intenso e importante que la producción en su área de origen. Además, es en América tropical donde se ha avanzado más en el conocimiento en materia de desarrollo genético y fisiológico del banano; así como de su producción comercial (Smith *et al.* 1992; León 2000).

## **2.2 BOTÁNICA**

### **2.2.1 Taxonomía**

Los bananos y plátanos pertenecen a un grupo de 30 y 40 especies conocidas incluidas bajo el género *Musa*, de la familia de las Musáceas y del orden Zingiberales (Soto 1992; INIBAP 2001). Este género está dividido en cuatro secciones que contienen especies productoras de semillas o aquellas que se reproducen por partenogénesis. Dos de las secciones contienen especies con un número de cromosomas de  $2n= 20$  (*Callimusa* y



*Australimusa*), mientras que las otras dos secciones (*Eumusa* y *Rhodochlamys*) tienen un número básico de cromosomas de 11 ( $2n=22$ ) (Daniells *et al.* 2001).

La mayoría de los bananos cultivados pertenece al grupo de EUMUSA, siendo ésta la sección más grande del género y con mayor distribución geográfica. Muchos de estos cultivares son diploides (AA y AB), triploides (AAA, AAB y ABB) y tetraploides (AABB y AAAB) (Soto 1992; León 2000). La mayor parte de los cultivares se derivan de dos especies, *M. acuminata* (con el genoma A) y de *M. balbisiana* (con el genoma B). Sin embargo se han identificado cultivares portadores del genoma S derivados de la hibridación con *M. schizocarpa* (Daniells *et al.* 2001).

La alta diversidad de los cultivares de *Musa* tiene su origen en los procesos naturales de partenogénesis, esterilidad de las semillas, poliploidía y de propagación vegetativa, unida a la posible selección humana (Simmonds 1987; León 2000). Esta interacción generó los grupos de bananos y plátanos cultivados: los diploides AA y AB (bananos de cocción y de postres) donde sobresalen los cultivares denominados 'Pisang Mas', por su amplio cultivo y consumo; 'Ney Poovan', de sabor agrídulce. Los triploides AAA, AAB y ABB (bananos de cocción y postre) entre los cuales están presentes la mayoría de los cultivares de banano de interés comercial como los cvs. 'Gros Michael' y 'Gran Enano'; los del grupo Cavendish y Valery. Los plátanos triploides se pueden clasificar en los que poseen racimos con un buen número de frutos pequeños como los cvs. 'Dominico' (French Plantain), 'Negrito Truncho Maqueño'; y aquellos que presentan racimos de pocos frutos grandes como los cvs. 'Liberal', 'Curraré' y el clon 'Bluggoe', del grupo ABB (León 2000). El tercer grupo lo comprenden los cultivares tetraploides ABBB, AAAB y AABB que fueron obtenidos de los cruces entre diploides AA y triploides AAB. Muchos de estos cultivares presentan calidad de fruto y resistencia a las diferentes enfermedades (León 2000).

El otro grupo de musáceas cultivadas pertenece a la sección AUSTRALIMUSA. Estos bananos incluyen sólo al grupo 'Fei'. Sus clones se cultivan en la Polinesia y se extienden hasta las islas Marquesas de Tahití y Hawai (León 2000), son diploides con un  $2n=10$  (Daniells *et al.* 2001). Los frutos son harinosos, con poco azúcar y para la ingesta requieren de cocción (Smith *et al.* 1992). Su centro de origen es desconocido, pero se les considera ancestro silvestre del género (Daniells *et al.* 2001). Se ha documentado que su cultivo es antiguo y que su domesticación se dio de manera independiente (León 2000).

En América Latina se encuentran cultivares principalmente triploides, importados desde África vía España (León 2000). Sin embargo, también se encuentran algunos de origen local, que se generaron por la aparición de formas producto de mutaciones espontáneas; así como de nuevos procesos de selección cultural (Smith *et al.* 1992).

### **2.2.2 Morfología**

Los bananos y plátanos son plantas rizomatosas, herbáceas, perennes de gran tamaño (Soto 1992). Poseen tallos subterráneos denominados cormos con crecimiento apical, de los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales. Forman pseudotallos aéreos constituidos por las vainas imbricadas de las hojas, las cuales están dispuestas en espiral. Las hojas son pecioladas, pinnatinervias y a menudo laciniadas (León 2000) El sistema radical está constituido por una raíz primaria de origen embrionario, la cual es reemplazada muy temprano por un sistema de raíces adventicias, de origen endógeno (Soto 1992).

Las flores están agrupadas en grandes inflorescencias terminales, formando racimos largamente pedunculados a partir del rizoma, que atraviesan internamente el pseudotallo (Soto 1992). El eje de la inflorescencia es la continuación del escapo floral y en él las hojas son reemplazadas por brácteas, de las cuales las tres o cuatro primeras son más grandes y no recubren ninguna de las flores. Las siguientes brácteas salen de la parte superior de los cojinetes florales y son caduceas (León 2000). Las inflorescencias están constituidas en grupos de flores, distribuidas acrópetamente y dispuestas a su vez en dos hileras, insertas en abultamientos del raquis (Soto 1992).

En las inflorescencias se distinguen tres tipos de flores: pistiladas, en las manos superiores; neutras, en varios cojinetes centrales y estaminadas en la parte terminal del racimo; aunque este orden no es estricto (León 2000). La flor se caracteriza por poseer un perianto formado por dos tépalos. El mayor, compuesto por la fusión de varias piezas, dispuestas de forma alterna; mientras que el tépalo menor es corto, ancho y casi transparente. Posee un ovario ínfero alargado y angosto en la base, por lo común curvo; mientras que el ápice es plano y ancho. Presenta placentación parietal en tres lóculos, con ovocélulas en dos o cuatro filas longitudinales. Las flores pistiladas presentan estambres reducidos, de anteras no fusionadas, con un pistilo bien desarrollado, el cual finaliza en un estigma globoso y ancho con cinco o diez lóbulos. Las flores hermafroditas poseen un ovario corto, poco desarrollado y con frecuencia estambres funcionales. Las

flores estaminadas tienen cinco o seis estambres, un estaminodio y un gineceo no funcional. (León 2000).

El fruto se desarrolla de los ovarios de las flores femeninas, por el aumento del volumen de las paredes de las tres celdas del ovario, relleno por completo la cavidad de los lóculos. Los óvulos son abortados y ennegrecen, mientras que el pericarpo se engruesa (León 2000).

### 2.2.3. Cultivares de estudio

- *Cultivar 'Dátil' o 'Lady's Fingers'*

Pertenece al grupo AA y se le considera como el único diploide comestible del tipo *acuminata*. También se le conoce como 'manzano', 'banano rosa' o 'bocadillo'. Las plantas se caracterizan por su poco vigor, alcanzando una altura de hasta 4m. El área foliar es pequeña, con hojas largas y angostas de color verde amarillento. Los pseudotallos son delgados y los cormos pequeños. Soportan la acción del viento debido a su eficiente sistema radical. Este cultivar es resistente a la "Enfermedad de Panamá" (*Fusarium oxysporium*) y muestra poca susceptibilidad a la "Sigatoka Negra" (*Microsphaerella fijiensis var difformis*). Las plantas producen racimos pequeños con gran número de dedos cortos; gruesos y rectos que dan al racimo una característica particular. Una vez que los frutos son cosechados, maduran muy rápido. Su pulpa es blanca o amarilla, suave, pastosa, muy dulce, y con mucho aroma. La cáscara es muy delgada y la cutícula es muy sensible a magulladuras, lo que dificulta su transporte a los mercados (Soto 1992).

Los frutos de este clon son muy apetecibles por algunos grupos étnicos, y aunque no existen plantaciones técnicamente cultivadas, recientemente se ha establecido un comercio entre Haití y República Dominicana y los mercados latinos de Florida y Nueva York, donde alcanzan precios dos veces superiores al valor de los bananos de las mejores marcas (Soto 1992).

- *Cultivar 'Curraré'*

El cultivar de plátano conocido como 'Falso Cuerno' o 'Curraré' pertenece al grupo AAB (Soto 1992). Como parte del grupo EUMUSA, probablemente tuvo su origen en la India. Actualmente constituyen una importante fuente de alimento en América tropical y en

África (INIBAP 2001). Poseen racimos medianos con frutos grandes de regular cantidad de dedos. Son plantas moderadamente vigorosas y presentan resistencia a la "Enfermedad de Panamá", muy susceptibles al ataque del 'picudo' (*Cosmopolites sordidus*) y a la infección de la "Sigatoka Negra". Este cultivar, junto con la variedad de plátanos conocida como 'Orishele', representan el 60% de la producción mundial de plátanos y su importancia económica deriva del creciente interés por parte de los mercados norteamericanos (Soto 1992; Grapin *et al.* 1999).

### 2.3 MEJORAMIENTO GENÉTICO de *Musa*.

La producción de banano y plátano tiene un alto impacto en la agricultura, economía y la alimentación de gran cantidad de países; por lo que es prioritario establecer estrategias que llenen las necesidades de obtener nuevas variedades mejoradas de manera rápida y eficiente; la propagación de material libre de plagas y enfermedades y la obtención de clones de alto rendimiento, con condiciones agronómicas de interés (FAO 2002).

Los programas de mejoramiento genético en banano y plátano están dirigidos a la obtención de semillas (Molina 1987). Para esto se debe contar con una plena identificación y caracterización de progenitores diploides; buscando tipos con atributos agronómicos y características de resistencia a enfermedades o plagas de interés comercial (Rosales y Pocasangre *sf*). Además de esta variabilidad, el material debe tener facilidades de cruzamiento "entre" y "dentro" de las diferentes especies o subespecies y tipos disponibles, así como de la habilidad combinatoria general y específica. Sin embargo, el gasto en espacio, tiempo e insumos es alto (Molina 1987), además de las limitantes que presenta el cultivo, debido a su alta esterilidad, triploidía y ausencia de semillas (Assani *et al.* 2001).

Desde 1984, la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) ha desarrollado un amplio programa para el mejoramiento de bananos y plátanos con resistencia a la "Sigatoka Negra" (Bermúdez 2000). La variabilidad genética utilizada en el programa deriva de accesiones formadas durante 1959 y 1961 de colecciones provenientes del Pacífico oeste y sudeste de Asia (Rosales y Pocasangre *sf*). Estos híbridos son bananos y plátanos diploides (AA, AB), triploides (AAA, ABB, ABB) y tetraploides (AAAB y AABB) con excelentes características de racimo y planta; además de presentar resistencia o tolerancia a la "Sigatoka Negra" y la "Sigatoka Amarilla"; así como al "Mal de Panamá"

(Krauss *et al.* 2001). También tienen un adecuado rango de adaptación a suelos y climas húmedos; pero algunos no tienen una calidad del fruto o duración de vida de anaquel (Rosales y Pocasangre *sf.*)

## **2.4 BIOTECNOLOGÍA en *Musa*.**

### **2.4.1 Generalidades**

Los adelantos en las técnicas de micropropagación de tejidos han revolucionado la multiplicación de los cultivos de banano y plátanos en estos últimos 30 años (FAO 2002), ya que permiten superar algunas de las limitaciones biológicas básicas de las plantas, además de lograr una mejor manipulación de su base genética (Rosell 1990), ampliando con esto, las fuentes de variabilidad preexistente en el genoma (Evans *et al.* 1981).

Con este conocimiento se complementan los programas de cruzamiento y se genera una respuesta rápida a la urgente necesidad de nuevas variedades con mejores características de productividad y resistencia a enfermedades tropicales (Escalant *et al.* 1994). Además, permiten la multiplicación masal de clones mejorados con caracteres específicos, sin cambiar otros atributos de interés agronómico y comercial. (FAO 2002) y ofrecen la opción de disminuir sustancialmente los costos de producción (Etienne y Berthouly 2002).

Sin embargo, se ha observado que durante la propagación clonal se puede presentar variabilidad en el cultivo, producto de la multiplicación *in vitro* (Côte *et al.* 2001) para gran cantidad de especies de importancia agrícola (Scowcraft y Larkin 1982). Por lo tanto, y a pesar de las ventajas que presentan las técnicas de cultivo *in vitro* en la micropropagación y mejoramiento genético de *Musa*, no se puede garantizar la uniformidad clonal del material producido, debido a la aparición de mutaciones y variaciones en genoma, lo cual evidencia cambios en la expresión genética inducida por las condiciones del medio y que no son heredables de acuerdo a las leyes de Mendell (Soto 1992).

Las posibles causas que podrían intervenir en la variación somaclonal de los cultivares del género *Musa* se desconocen, pero algunos factores decisivos podrían ser:

- alta humedad relativa y bajos niveles de luz (Sandoval 1994)
- el mosaico genético
- el número de los subcultivo, durante el cultivo *in vitro*
- las concentraciones de los reguladores de crecimiento como BA (N<sup>6</sup>-benzyladenina) y en especial el 2,4D (Ácido 2,4-Diclorofenociacético) ya que muestran un mayor porcentaje de anomalías de origen mitótico, que aquellas propagadas por métodos clásicos (Giménez *et al.* 2001)
- el genotipo donador (Giménez *et al.* 2001)
- las variaciones epigénicas (Scocraft y Larkin 1982),

Algunos de los tipos de variantes somaclonales encontrados en *Musa* son: enanismo, gigantismo o porte alto; filotaxia anormal; mosaico, variegación, masada, coloración atípica del pseudotallo, lámina foliar anormal, peciolo alado, reversión del tipo 'French' en el cv. 'Curraré' y del Valery en el cv. 'Gran Enano', tipo plátano a banano; persistencia de flores en el racimo; malformación de flores; flores sólo masculinas; racimos anormales, dedos deformes; rajaduras de los dedos; resistencia a *Fusarium oxysporium ssp cubense* (Soto 1992).

La FAO (2002) plantea a futuro los siguientes beneficios de las técnicas biotecnológicas aplicadas al cultivo de banano y plátano:

- rendimiento potencial, en comparación con las plantas obtenidas mediante la producción convencional;
- la producción de plántulas exentas de patógenos, que disminuyan el impacto de plagas que afectan la producción del cultivo;
- el levantamiento de un mapa del genoma de banano que permita una mejor comprensión de las funciones de sus componentes genéticos, con lo cual se establecería la base para el desarrollo y la selección de clones con cualidades comerciales;
- La reducción de la aplicación de plaguicidas y fungicidas, logrando así una disminución del impacto económico a la salud y al ambiente; así como evitar que se establezcan poblaciones de patógenos resistentes a diferentes químicos.

#### 2.4.2 Embriogénesis Somática en *Musa*

Con el aumento del interés en las investigaciones sobre propagación clonal, se han desarrollado eficientes sistemas de regeneración celular; los cuales constituyen la base para la aplicación práctica de las técnicas de transformación genética para el mejoramiento genético no convencional (Swamy *et al.* 1983). No obstante, se ha probado que la capacidad regenerativa de las plantas no es igualmente efectiva en todas las especies, ya que existe un fuerte control de factores genéticos, epigenéticos, fisiológicos y de condiciones ambientales que pueden influir en la pérdida de dicha capacidad (Halperin 1991; Thorpe 1994).

La embriogénesis somática se basa en el principio de totipotencia celular, según el cual las células mantienen la capacidad de expresar todo el potencial genético de la planta donante (Halperin 1991). Los embriones somáticos tienen, al igual que los embriones cigóticos, la disposición genética de formar una nueva planta después de un proceso de germinación; con la diferencia de que la primera se lleva a cabo por reproducción asexual, mientras que la segunda ocupa de la fusión de gametos (Pérez *et al.* 1999); es decir, en la embriogénesis somática no se introduce un nuevo juego de genes.

Se conocen dos patrones de desarrollo de la embriogénesis somática: la vía directa y la vía indirecta (Ammirato 1989). La primera se presenta cuando las células están estimuladas fisiológicamente para un desarrollo embriogénico, iniciando así la división celular para expresar esta vía. Algunas de estas células forman parte del tejido reproductivo de la planta como la nucela, las células sinérgicas y el hipocótilo; o bien células somáticas de diferentes tejidos y órganos. Para el patrón indirecto se requiere una fase intermedia de callo, del cual prolifera y se desarrolla un tejido embriogénico (Ammirato 1987). Para esto se requieren reguladores del crecimiento que estimulen el proceso de desdiferenciación-rediferenciación de las células (Thorpe 1994); así como para activar los genes que controlan los procesos embriológicos de la planta y se alcance la competencia embriogénica (Marroquín 1991).

Los primeros estudios en embriogénesis somática *in vitro* se realizaron en zanahoria (*Daucus carota*) por Stewart y Reinert en 1958 (Pérez *et al.* 1999). La embriogénesis somática en *Musa*, fue descrita por primera vez por Cronauer y Krikorian (1983), partiendo de ápices cultivados *in vitro*. Como explantes del proceso de embriogénesis somática en *Musa* se han utilizado láminas foliares o fragmentos de rizoma de vitroplántulas (Novak *et al.* 1989); embriones cigóticos inmaduros (Cronauer y Krikorian

1988, Escalant y Teisson 1988, 1989); yemas (Dhed'a *et al.* 1991); así como suspensiones celulares embriogénicas de *Musa* (Marroquín 1991) y flores masculinas y femeninas de diferentes cultivares (Ma 1991, Escalant *et al.* 1994, Grapin *et al.* 1998 y 2000).

En este momento se considera que la capacidad que presentan los cultivos embriogénicos de multiplicarse indefinidamente, es uno de los aspectos más importantes para lograr un sistema eficiente para la producción masiva de plantas mejoradas (de Feria *et al.* 2000). De igual manera, se ha demostrado que la organogénesis no es apropiada para la transformación genética, debido a que se producen muchas plantas quiméricas (Khalil *et al.* 2002); mientras que los protocolos de embriogénesis somática, usando suspensiones celulares, tienen la capacidad de producir clones idénticos del material regenerado (Grapin *et al.* 1996). Sin embargo, este proceso se ha logrado en pocas especies, aunque siempre con un mayor éxito en la producción de plántulas (Pérez *et al.* 1999).

### **2.4.3 Ontogenia de Embriogénesis Somática**

La embriogénesis somática en plantas se caracteriza por la formación de una nueva planta a partir de una estructura bipolar (eje raíz-vástago), la cual surge de una o varias células no cigóticas y no muestra conexión vascular con el tejido materno (von Arnold *et al.* 2002). El proceso de embriogénesis somática depende de una serie de eventos de desdiferenciación y rediferenciación de células y su subsiguiente proliferación. Las células se reorganizan y varían su respuesta según los recursos del explante y su ambiente, generando cambios en la tasa de crecimiento, posición y desarrollo (Halperin 1991).

La embriogénesis somática consta de cuatro fases: inducción de la embriogénesis somática; desdiferenciación celular y rediferenciación del tejido, que abarca la formación de un callo y el desarrollo del embrión; la maduración y la germinación. En cada uno de estos eventos se requieren distintos estímulos, como diferentes reguladores de crecimiento (relación auxinas/citoquininas, ácido abscísico, giberelinas), luz, temperatura y nutrientes disponibles (Pérez *et al.* 1999).

#### *i. Inducción de la embriogénesis somática*

Durante la etapa de inducción, el material previamente seleccionado como explante es sometido a diferentes concentraciones de auxinas y en algunos casos citoquininas (von



Arnold *et al.* 2002), que generan cambios drásticos en los modelos de expresión genética, estimulando a las células somáticas a variar su patrón normal de desarrollo hacia la vía embriogénica (Pérez *et al.* 1999).

Dentro de los factores determinantes de esta etapa de la embriogénesis somática están: el genotipo, el cual puede presentar diferencias notables en la activación de los elementos claves para iniciar el proceso; la desdiferenciación de las células del explante, siendo más factible que resulte el proceso en tejidos jóvenes; la relación de auxinas/citoquininas, que estimula el cambio de patrón de expresión genética de las células y el aislamiento celular (Ammirato 1989; Pérez *et al.* 1999).

### *ii. Desdiferenciación y rediferenciación del tejido*

Durante esta etapa las masas de células proembriogénicas se diferencian formando embriones somáticos, mediante la división y diferenciación celular simultánea. Para lograrlo se debe dar una disminución de la concentración de auxinas exógena (Ammirato 1989). En esta fase se observa la polarización en las masas de células proembriogénicas y los embriones pasan por los diferentes estados de desarrollo intermedio semejantes a los de la embriogénesis cigótica (Pérez *et al.* 1999; von Arnold *et al.* 2002).

A los 17 días de poner a regenerar una suspensión celular de plátano, Grapin *et al.* (2000) observó la presencia de agregados de células proembriónicas en estado globular, formando grupos de diferente tamaño de células rodeadas por paredes celulares delgadas. Para el día 23, el cultivo muestra proembriones en diferentes estados de desarrollo, algunos de los cuales ya han desarrollado epidermis y presentan acumulaciones de almidón. Un mes después, se observan embriones somáticos definidos por una epidermis uniforme, un meristemo caulinar, una raíz polar muy rica en almidón y bandas provasculares. Côte *et al.* 1996 indican que, a los 20 días, la regeneración en el cv. 'Gran Enano' presenta grupos de dos a diez células con paredes delgadas y compartimentos internos.

### *iii. Maduración*

Esta etapa se inicia con el estadio de torpedo del embrión, sin embargo éste aún no posee la capacidad de germinar, ya que no ha acumulado sustancias de reserva, a diferencia de los embriones cigóticos (Ammirato 1987). Para lograr la germinación se requiere de una fase de maduración, en la cual se lleva a cabo el alargamiento celular,

sin división celular. Para esto debe contar con estímulos externos como el suministro de ácido abscísico o reducción del potencial osmótico (von Arnold *et al.* 2002), con una subsiguiente desecación del tejido.

Algunos embriones, en esta fase, presentan un evento similar al que se observa en la embriogénesis sexual con la iniciación del primordio del cotiledón y estados tempranos de diferenciación; el cambio de las formas de las células y la demarcación de los ápices del vástago y radicular (von Arnold *et al.* 2002). Este mismo fenómeno se ha observado en suspensiones celulares de zanahoria (Ammirato 1987).

#### *iv. Germinación*

Durante esta fase el embrión aumenta su longitud y se reactivan los procesos metabólicos para convertirse en plántula. Algunos de los estímulos conocidos son la luz, el ácido gibberélico y las citoquininas. Durante este periodo se debe aumentar la cantidad de nutrientes en el medio, porque estos embriones carecen de tejidos de reserva (Pérez *et al.* 1999).

Durante esta fase, Escalant y Teisson (1989), observaron que el desarrollo de los embriones somáticos y cigóticos de *Musa* es similar: una epidermis rodeando totalmente al embrión, la emergencia de la plúmula, parénquima de reserva y bandas vasculares. De igual manera, Zhao *et al.* (1999) reportaron que durante la embriogénesis somática en arroz (*Oryza sativa*) se puede observar la existencia de una pequeña área llena de orificios, de la cual surge la plúmula y en posición opuesta a la radícula. Sin embargo, en embriones deformes sólo se observa la plúmula.

En el 'Gran Enano', Côte *et al.* (1996) indican que la aparición de los primeros embriones visibles se presentó entre el día 20 y el 30, después de haberse iniciado el proceso de regeneración en medio Ma<sub>3</sub>. La característica predominante en los embriones fue la presencia de la depresión cotiledonar, que indica la zona donde se conjugan los cotiledones y la zona apical y el sitio de inicio de los haces vasculares con que conecta los meristemas apical y radicular (Dhead'a *et al.* 1991). En otros casos, a los 40 días, se distinguían algunas evidencias de diferenciación del embrión como la presencia de primordios, plúmula emergente rica en células con almidón, bandas procambiales, entre los brotes y una epidermis rodeando al embrión.

#### **2.4.4 Cultivo en medio líquido**

El uso de los medios de cultivo líquidos para las técnicas de micropropagación ha resultado altamente eficiente, sobre todo para la embriogénesis somática, debido a que puede promover una mejor uniformidad de las condiciones de cultivo; un manejo fácil y rápido; y mejora los niveles de asepsia (Alvard *et al.* 1993; Etienne y Berthouly 2002).

Para un sistema automatizado que utiliza bioreactores, como el de inmersión temporal RITA®, el uso de los medios de cultivo líquidos se convierte en un factor determinante del proceso debido a que interviene en el incremento del número de plantas obtenidas y, además, al estar libre de gelificante se facilita la absorción de nutrientes. Así mismo, por su uso permite un aumento en la productividad de los operarios, ya que facilita los procesos de preparación, esterilización y manipulación; reduce los periodos de subcultivo y la contaminación provocada por la manipulación de los explantes. Con esto se disminuyen los costos y el tiempo de producción, lo cual favorece el desarrollo de un sistema automatizado (Alvard *et al.* 1993; Gonzaga 2001; Etienne y Berthouly 2002).

No obstante, se debe tomar en cuenta que los medio de cultivo líquido también presentan una serie de efectos fisiológicos negativos sobre las plántulas como la hiperhidricidad, la asfixia de los explantes y las fuerzas de esqueleo; además el equipo puede resultar complejo de manejar (Debergh *et al.* 1981; Etienne y Berthouly 2002). Como método preventivo se procura mantener una inmersión parcial del explante, asegurando su aireación (Alvard *et al.* 1993). Para esto se han desarrollado algunas estrategias de manejo como lo son el uso de soportes que permitan establecer una barrera física entre el material usado y el medio; el mantenimiento de un volumen de medio adecuado que permita la emergencia parcial del tejido y la oxigenación directa al medio (Alvard *et al.* 1993; Etienne y Berthouly 2002). Además se ha considerado la posibilidad del diseño de aparatos que eviten la exposición continua de los explantes al medio líquido, mediante la adición de este en forma intermitente y con frecuencias diferentes (Teisson y Alvard 1994).

##### ***i. Suspensiones Celulares Embriogénicas***

Las suspensiones celulares embriogénicas fueron estudiadas por primera vez en zanahoria por Halperin en 1964 (Ammirato 1989). Se les define como células libres de núcleo grande, generalmente con un solo nucleolo y agregados celulares friables e indiferenciados, distribuidos en un medio líquido en movimiento (Grapin *et al.* 1998; Ortiz

2001). Se obtienen cuando los explantes son expuestos a altas concentraciones de auxinas, induciendo la división celular desorganizada del tejido (Pérez *et al.* 1999) y forman una mezcla compleja de diferentes tipos y grupos de células que se diferencian en tamaño, apariencia, conjugación, contenido nuclear y de las cuales, la minoría ha completado la transición de células somáticas a células embriogénicas (Narayanaswamy 1977).

Como material de inicio se utiliza callos friables de alta frecuencia, producto de embriogénesis somática y embriones somáticos en estados de globular a corazón, los que serán expuestos a la 2,4-D u otro regulador de crecimiento análogo en medio líquido y con agitación constante; lo cual se propicia la fragmentación del callo y estimula la producción de células libres y nuevos agregados celulares (Pérez *et al.* 1999). Para la evaluación del mantenimiento se realiza una curva de crecimiento de la suspensión que indica el proceso de desarrollo celular, asociado a la cantidad de nutrientes presentes en el medio. Así mismo, indica el momento en el cual se requiere cambiar el medio de cultivo, para continuar con los procesos fisiológicos normales de la suspensión.

La curva de crecimiento de una suspensión celular es de forma sigmoidea y está compuesta por cuatro fases: fase inicial de reposo, periodo de adaptación antes de la aceleración de la división celular; fase logarítmica, donde se da una aceleración de la división celular produciendo un aumento exponencial en el número de células; fase lineal, que presenta un incremento en el peso fresco y seco de las células; fase de desaceleración progresiva, en la cual la tasa de división celular disminuye debido al agotamiento de los nutrientes del medio y a la acumulación de los desechos y restos celulares y la fase estacionaria, en la cual no hay división ni crecimiento celular. Es durante este periodo cuando se debe realizar un cambio del medio de cultivo (Pérez *et al.* 1999).

La regeneración por embriogénesis somática de suspensiones celulares de *Musa* fue descrita por primera vez por Cronauer y Krikorian (1983). Posteriormente Dhed'a *et al.* (1991) lograron la multiplicación de yemas en medio líquido;; Marroquín (1991) estableció suspensiones celulares embriogénicas, con su posterior regeneración, a partir de embriones cigóticos inmaduros de *Musa acuminata ssp burmanicoides* y *M. acuminata ssp malaccensis*; Escalant *et al.* (1994) trabajaron con embriones somáticos del cv. 'Gran Enano' (*Musa* AAA) usando explantes de manitas florales en el sistema de inmersión temporal y Grapin *et al.* (1998 y 2000) usaron suspensiones embriogénicas de flores

masculinas y femeninas de *Musa* para regeneración por vía de embriogénesis somática. López *et al.* (2000) obtuvieron suspensiones celulares embriogénicas de plátanos (AAB).

La regeneración de plantas, usando las suspensiones celulares embriogénesis de *Musa*, permite manejar un material más homogéneo, que tiene el potencial para producir plantas no quiméricas. Sin embargo su limitación es la baja tasa de germinación y de regeneración de las plantas; así como el largo periodo de tiempo entre la iniciación del cultivo y la planta regenerada (Khalil *et al.* 2002).

## **ii. Inmersión Temporal**

La aplicación a escala comercial de las técnicas de micropropagación se ha visto limitada por factores, tales como las bajas tasas de multiplicación, calidad de los explantes y los altos costos de producción (Castro *et al.* 2002). La producción de vitroplantas constituye la más importante aplicación del cultivo de tejidos, siendo las tecnologías de propagación vía organogénesis las más empleadas para tales fines (Pérez *et al.* 2000); sin embargo, esta vía morfogénica no resulta igual para todos los cultivos (de Feria *et al.* 2000). No obstante, diferentes estudios muestran que con la embriogénesis somática se obtienen mayores volúmenes de producción en el tiempo y a un costo más bajo; lo cual lo convierte en el sistema de regeneración más eficiente (de Feria *et al.* 2000). Además, la embriogénesis somática de alta frecuencia presenta un potencial de multiplicación muy elevado, con aptitudes para la automatización del sistema gracias a la friabilidad y la robustez del material; así como la utilización de medios líquidos (Etienne *et al.* 1997; Solano 2001).

Con el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas y un mayor conocimiento y manejo de la dinámica metabólica de las mismas, se presentan condiciones claves para la aplicación de la metodología de inmersión temporal en la micropropagación masiva de materiales con importancia económica (Gómez-Kosky *et al.* 2000). No obstante, en muchas especies aún no se ha logrado un mantenimiento eficiente de las suspensiones celulares (Lerma *et al.* 2002) y aunque el medio de cultivo líquido se adapta a la fase de proliferación de plántulas, las fases de desarrollo y aclimatación se deben llevar a cabo en medios semi-sólidos (Etienne *et al.* 1997).

El sistema de inmersión temporal se basa en el uso de recipientes estériles especiales diseñados para la proliferación de material *in vitro* y además brinda un exacto monitoreo y control computarizado de las condiciones de cultivo (de Feria *et al.* 2000; Solano 2001);

así mismo combina la aireación con los efectos positivos de los medios líquidos (Etienne y Berthouly 2002). Estos sistemas se desarrollaron inicialmente empleando unidades de filtración comercial, las cuales fueron modificadas conectando el compartimiento inferior con el superior mediante un tubo y colocando entre ellos una malla como sostén del explante. Con la aplicando periódica de una presión de aire al compartimiento inferior, se hace subir el medio de cultivo, irrigando el material vegetal de acuerdo a un programa predeterminado controlado por un cronómetro y válvulas solenoides (Alvard *et al.* 1993, Teisson *et al.* 1996).

La principal ventaja de este sistema es que, al evitar una inmersión continua del material vegetal, se generan beneficios positivos sobre el crecimiento y la morfogénesis de los explantes. Otras ventajas son el adecuado flujo de oxígeno, el movimiento constante, niveles límite de esqueleo, los cambios periódicos de medio de cultivo (Etienne y Berthouly 2002). Con la eficiencia del sistema se lograría la automatización de una o más etapas en los procesos de producción, generando el aumento de la proliferación de embriones consistentes, sincrónicos y bien desarrollados (Etienne y Berthouly 2002; Gómez-Kosky *et al.* 2002). Las plántulas obtenidas tendrán mayor eficiencia fotosintética, un aumento de la superficie funcional de las hojas, mayor vigor de las raíces y acumulación total de la masa seca, esto en comparación con las plantas obtenidas mediante la producción convencional (Solano 2001; Etienne y Berthouly 2002). Además se disminuyen los costos y los tiempos de producción (Kozai *et al.* 1997) la reducción del espacio (Castro *et al.* 2002) y se mejoran los niveles de contaminación microbiana (Roche 1996).

Los tiempos y la frecuencia de inmersión son los factores decisivos en el sistema de inmersión temporal, así como la ventilación y el volumen del medio de cultivo líquido (Etienne y Berthouly 2002); sin embargo se han observado diferencias en los resultados entre las especies usadas y los distintos sistemas de regeneración. El sistema de inmersión ha sido reportado para varias especies como la papa (Akita y Takayama 1994; Pérez *et al.* 2001), café ( Etienne *et al.* 1999b), en *Citrus* (Cabasson *et al.* 1997), en *Hevea brasiliensis* Müll. Arg (Etienne *et al.* 1997b), caña de azúcar (Lorenzo *et al.* 1998), piña (Escalona *et al.* 1999), en diferentes clones de té (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) (Akula *et al.* 2000), en *Cucumis sativa* L. (Konstas y Kintzios 2003). Alvard *et al.* (1993) trabajaron con el recipiente filtrado de Nalgen® de Nalgene, adecuado para inmersión temporal, usando meristemas de *Musa acuminata*; Escalant *et al.* (1994) utilizó el mismo recipiente para la amplificación de embriogénesis somática de flores masculinas de varios

cultivares de *Musa* (Etienne y Berthouly 2002). Gómez-Kosky *et al.* (2002) trabajaron en embriogénesis somática en medio líquido con el híbrido FHIA-18 (AAAB), utilizando varios bioreactores, entre de ellos, el recipiente RITA® (Teisson *et al.* 1996).

### **iii. Recipientes de inmersión temporal**

Se han descrito varios sistemas de inmersión temporal que tienen en común la existencia de recipientes transparentes autoclavables los cuales difieren en el tamaño del recipiente, el tipo de soporte, la existencia de un sistema computarizado de control o un simple cronómetro, el uso de bombas peristálticas de aire o mecánicas para el flujo del medio; así como de la existencia los sistemas de reciclaje del medio y tanques para la separación e incorporación del medio de cultivo al contenedor de los explantes (Etienne y Berthouly 2002).

En la actualidad se cuenta con cuatro tipos diferentes de sistemas de inmersión: (Etienne y Berthouly 2002)

- Sistemas con máquinas inclinadas o ejes de balancín, los cuales no incluyen llenado del medio de cultivo líquido.
- Sistemas con inmersión completa y mecanismos de renovación del medio de cultivo líquido mediante el drenaje periódico del medio de cultivo líquido con adición de medio de cultivo fresco y estéril. Es usado en procesos de largo tiempo en plantas de cultivo *in vitro*.
- Sistemas con inmersión parcial y mecanismos de renovación del medio de cultivo líquido. El medio de cultivo líquido es aplicado con frecuencia, pero usando el mismo medio. Este medio de cultivo debe ser cambiado periódicamente.
- Sistema con inmersión temporal completa por transferencia neumática del medio de cultivo líquido, pero sin que se llene totalmente. Este es el tipo más reciente de los sistemas de inmersión temporal. Todas las partes del explante mantienen contacto con el medio de cultivo líquido llevándose a cabo una renovación completa de la atmósfera, por el uso de una fuerza de empuje que se genera por una bomba de presión, que envía el medio al material vegetal. Ejemplos de este tipo de sistema son los recipientes RITA® y Nalgen® de Nalgene.

➤ *RITA®*

El Recipiente de Inmersión Temporal Automático, conocido como RITA®, fue desarrollado por Teisson *et al.* (1996) y es un equipo sencillo de inmersión temporal (Figura 1., Anexo 1.). Es empleado para el cultivo de microesquejes y embriogénesis somática en varias especies de interés hortícola, con altas tasas de multiplicación y permitiendo con esto disminuir los costos de producción y reducir los riesgos de contaminación (Castro *et al.* 2002)

Este recipiente (Figura 1, Anexo 1.) se fabrica con "polysulfone" reutilizable y es autoclavable, con uso hidropónico. Después de la transferencia de los explantes, el contenedor es conectado a una bomba de sobrepresión a 0,2 bar en el cuarto de cultivo. El flujo del aire es limitado por una válvula externa; la frecuencia y el periodo de inmersión son controlados por un sistema automático (Teisson *et al.* 1996). Este recipiente posee dos compartimentos separados por un tamiz o malla de poliuretano con poros de 400µM de grosor, en la cual serán colocados los explantes. Su funcionamiento consiste en la aplicación de un flujo de aire inyectado desde una bomba de aire, que permite la entrada del medio de cultivo líquido desde el compartimento inferior a la zona donde se encuentra el material vegetal, por un periodo y frecuencia determinada. El medio presente en el contenedor será removido rápida y uniformemente, a través de un mecanismo automático (CIRAD 2002).

➤ *Nalgen® de Nalgene*

La unidad de filtración autoclavable (Nalgene, Nalge®) (Figura 2., Anexo 1.) es un recipiente de 500ml con dos compartimentos conectados con un tubo de silicón a un conducto de ventilación con un filtro de 22µ de grosor de poro, que impide el movimiento del material vegetal en estudio (Alvard *et al.* 1993).

Este envase es usado para cultivos en inmersión temporal, aunque su uso no está ampliamente publicado, pero es tomado en cuenta como uno de estos sistemas. En este recipiente los explantes son colocados en el compartimento superior y en el inferior se mantiene el medio de cultivo líquido. Las sustancias nutritivas suben al primer compartimento a través de una presión generada por una bomba de aire y bañan completamente el material vegetal. El medio líquido sube a través del conducto de ventilación entre los dos compartimentos, posteriormente desciende a través de un sistema de aireación con una válvula solenoide que permite el flujo por gravedad al dejar de funcionar la bomba de presión (Alvard *et al.* 1993).



## 2.5 ACLIMATACIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, un alto porcentaje del material producto de la micropropagación convencional presenta bajas tasas de éxito durante la etapa de aclimatación en invernadero (Etienne y Berthouly 2002), lo cual limita la aplicación de las técnicas de micropropagación (Pospíšilová *et al.* 2000).

Según Pospíšilová *et al.* (1999), las condiciones especiales del microambiente *in vitro* influyen en la formación de las vitroplántulas, ocasionando anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas. Las más notables de las características observadas en vitroplántulas son el retardo en el desarrollo de la cutícula y de las capas epicuticulares, además de aparato fotosintético deficiente. Algunas de las características de este microambiente son una alta humedad relativa, una menor radiación que la presente en condiciones de cultivo convencional y un menor movimiento del aire que incrementa la capa límite de la hoja, que restringe la entrada y salida del flujo de CO<sub>2</sub> de la planta. También se tiene que tomar en cuenta, que el medio de cultivo le brinda al material la fuente de carbono y los reguladores de crecimiento necesarios para su regeneración.

Durante la transferencia *ex vitro* estas plántulas pueden estar deterioradas por los cambios súbitos en las condiciones ambientales y nutricionales. En consecuencia un alto porcentaje de plántulas muere durante el periodo de aclimatación, generándose así las bajas tasas de sobrevivencia del material (Pospíšilová *et al.* 2000). Además, al no poseer un eficiente sistema de defensa mueren por problemas fitosanitarios.

Se ha observado que las plantas producidas por técnicas de inmersión temporal presentan varias ventajas sobre la micropropagación convencional (Roche 1996; Bunga y von Aderkas 1992; Etienne y Berthouly 2002), generando individuos con un desarrollo más rápido y vigoroso durante la etapa de aclimatación. (Sha *et al.* 2002). Además, por su similitud con los procesos fotoautotróficos, se mejora el enraizamiento *in vitro* y se disminuye la hiperhidricidad de las vitroplántulas (Kozai *et al.* 1991).

## 2.6 COSTOS DE PRODUCCIÓN

La micropropagación de plántulas tiene muchas ventajas sobre la propagación convencional; sin embargo, en términos comerciales el uso de esta técnica está limitada por los altos costos de producción, lo que implica principalmente la mano de obra, las bajas tasas de crecimiento y la pobre sobrevivencia de las plántulas durante la aclimatación (Kozai *et al.* 1997; Espinosa *et al.* 2002; Etienne y Berthouly 2002).

Como posible solución se requiere de un sistema automatizado por unidades operacionales que produzca individuos genéticamente idénticos a gran escala, fisiológicamente uniformes, que presenten un desarrollo normal, libres de patógenos y que puedan ser aclimatados en un periodo de tiempo reducido y a costos bajos (Kozai *et al.* 1997). De esta manera los costos de producción serían disminuidos substancialmente (Kee-Youeup *et al.* 2001); además, se pueden controlar de manera más eficiente las propiedades físico-químicas de los recipientes de cultivo (Mavituna y Buyukalaca 1996). Firoozanbady y Gutterson (2003) en su estudio sobre métodos de propagación efectivos en piña, indican dos pasos para obtener costos más eficientes primero realizar un corte longitudinal de las yemas axiliares, que produzca nuevos brotes y el uso de bioreactores de inmersión temporal (TIB). Sin embargo existen algunas limitaciones especiales propias del cultivo, como es el caso de las violetas africanas y las lechugas, las cuales presentan ápices múltiples regenerados que necesitan ser separados a mano (Kozai *et al.* 1997).

La técnica de inmersión temporal es una opción de un sistema automatizado para la producción, el cual brinda mejoras tanto en la relación de costo-beneficio ya que disminuye los gastos de producción y operación, que oscilan entre el 40 y el 60% de los costos totales (Espinosa *et al.* 2002; Etienne y Berthouly 2002), como en el tiempo de producción. Además de presentar tasas mayores de multiplicación y germinación del material (Akula *et al.* 2000); con un material más sano, homogéneo y con menor grado de hiperhidricidad (Cabasson *et al.* 1997) y generar individuos mejor adaptados a las condiciones *ex vitro* del invernadero (Kozai *et al.* 1997; Escalona *et al.* 1999; Etienne y Berthouly 2002).

El sistema de inmersión temporal se ha aplicado para algunos cultivos como es el caso de banano (Alvard *et al.* 1993; Teisson *et al.* 1996), café, cítricos, orquídeas, pino, papa, piña y plátanos, aunque los funcionamientos precisos aún se desconocen (Alvard *et al.* 1993; Etienne y Berthouly 2002). Para la mayoría de estos casos se ha obtenido un aumento aceptable en la producción de vitroplantas, con una disminución en costos y tiempo (FAO 2002); así como disminuir la presencia de plantas quimérica (Espinosa *et al.* 2002). Sin embargo el sistema aún no está totalmente ajustado para la mayoría de los cultivos (FAO 2002). No obstante, se estima un aumento en la producción, con un mejor manejo del material, disminución de gastos (Etienne y Berthouly 2002), aunque faltan muchos detalles técnicos y biológicos que afinar (CIRAD 2002).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El trabajo se llevó a cabo en los Laboratorios de Biotecnología del CATIE, ubicados en Turrialba, Costa Rica.

#### 3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL

##### 3.2.1 Material Vegetal

Se utilizaron suspensiones celulares embriogénicas (SCE) de 10 meses de edad de dos cultivares, inducidas y multiplicadas en el laboratorio de Biotecnología del CATIE: 'Dátil' (grupo AA, subgrupo **Sucrier**) y 'Curraré' (grupo AAB, subgrupo **Plantain**). Las suspensiones celulares utilizadas fueron tomadas en fase de crecimiento exponencial a los 15 días después de iniciado su cultivo.

##### 3.2.2 Recipientes de cultivo

Los recipientes evaluados para inmersión temporal fueron: el bioreactor RITA®, del Laboratorio VITROPIC S.A./CIRAD, Francia (Teisson *et al.* 1996); con una capacidad de 500ml y el recipiente de filtrado de la marca Nalgen® de Nalgene de 500ml, modificado para la inmersión temporal (Alvard *et al.* 1993). El tratamiento testigo se realizó en plateos usando medio de cultivo semi-sólido en cajas de Petri con una capacidad de 100 x 15 ml.

##### 3.2.3 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en todas las fases de regeneración de *Musa* fueron desarrollados por Ma (1991).

Las SCE fueron multiplicadas en el medio de cultivo líquido Ma<sub>2</sub>, en erlenmeyers de 250ml. En la fase de regeneración dichas suspensiones se cultivaron en platos Petri de 100 x 15 ml en el medio semi-sólido Ma<sub>3</sub>, para la fase de regeneración de los embriones. Las fases de germinación y desarrollo se cultivaron en los medios líquidos Ma<sub>4</sub> y Ma<sub>5</sub>,

respectivamente; usando los recipientes para inmersión temporal RITA® y Nalgen®. En el tratamiento testigo se utilizó el protocolo establecido, utilizando los medios Ma (1991) para cada fase, se adicionó Phytigel como gelificante. La formulación detallada para cada uno de los medios de cultivo utilizados se muestra en el Cuadro 2 (Anexo 1.).

### **3.2.4 Condiciones de cultivo**

Todos los cultivos se conservaron en cuartos bajo condiciones controladas de temperatura ( $27 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y fotoperiodo (12 horas). Los erlenmeyers con las suspensiones celulares embriogénicas en multiplicación permanecieron en agitación constante a 100 rpm y bajo luz indirecta. Para la fase de regeneración los platos Petri se colocaron a la oscuridad. Durante las fases de germinación y desarrollo el material fue expuesto a luz fluorescente directa.

## **3.3 METODOLOGÍA**

### **3.3.1 Manejo de las suspensiones celulares embriogénicas**

#### ***3.3.1.1 Multiplicación de las SCE***

Las suspensiones celulares utilizadas fueron iniciadas y mantenidas bajo el protocolo propuesto por Côte *et al.* 1996. Para este estudio se tomaron SCE, del mismo origen y con 10 meses de edad, de tres muestras diferentes por cada cultivar.

Primero se realizó una filtración de las SCE con un tamiz de  $500\mu$  de grosor, para establecer una muestra de tamaño estándar y hacer las mediciones de masa celular total. Seguidamente, las suspensiones fueron multiplicadas en erlenmeyers de 250 ml, conteniendo 50 ml de medio Ma<sub>2</sub> y 1,5 ml de la masa celular. Se realizaron subcultivos cada 15 días para mantener la SCE en condiciones ideales y al mismo tiempo se efectuaron plateos cada 8 días en platos Petri con medio Ma<sub>3</sub>, para así determinar su capacidad regenerativa

La capacidad multiplicativa del material celular fue valorada según la cantidad y la calidad de las suspensiones celulares. De esta manera se evaluó la tasa de crecimiento del material en suspensión a través de la determinación de la biomasa inicial y final, cada 15 días, antes del subcultivo. La calidad de la suspensión se determinó mediante

observaciones al microscopio para el conteo y la clasificación del material en relación con los agregados celulares, células llenas y células vacías presentes en un área de 10 micras<sup>2</sup>. Para esto se tomaron tres muestras por tratamiento durante un mes durante cada subcultivo y la medición se realizó con la ayuda de un microscopio de luz y un hematocímetro. El objetivo de esta evaluación fue definir que los inóculos de SCE usados en la fase de germinación, mantuvieran un potencial de regeneración homogéneo.

### **3.3.1.2 Regeneración de las SCE**

A pesar de que la fase de regeneración no era objeto de estudio en esta investigación fue necesario establecer embriones con un desarrollo homogéneo hasta el estado globular, para la evaluación de las siguientes fases.

Para esto, se tomaron tres muestras por semana de cada erlenmeyer de las SCE usadas, con un volumen de 1 ml de células en suspensión (0,03 ml de masa celular / ml de medio). Se colocaron en diferentes cajas Petri con medio Ma<sub>3</sub> (Cuadro 2, Anexo 1.), bajo luz indirecta. Este procedimiento se llevó a cabo durante un periodo de dos meses y medio.

Una vez que fue evidente la presencia de los primeros embriones en estado temprano para cada cultivar, se dio inicio a la evaluación quincenal del material, para así estimar el porcentaje de regeneración. Como criterio de clasificación se constató que la muesca de los embriones estuviera bien formada, con base en las caracterizaciones de embriones somáticos realizadas por Escalant y Teisson (1988), Escalant y Teisson (1989), Côte *et al.* (1996) y Grapin *et al.* (2000). Se hicieron evaluaciones semanales del material, dividiendo los platos Petri en cuadrantes y realizando una estimación visual de cada plato.

### **3.3.2 Estudio de la fase de germinación de embriones**

Durante esta fase los embriones globulares, producto de la regeneración, fueron colocados en los recipientes para inmersión (RITA® y Nalgen®) con el medio de cultivo Ma<sub>4</sub>. En cada caso se realizaron inoculaciones con cantidades de 0.5, 1.0 y 1.5 g. de embriones, según lo dispuesto en el Cuadro 1 (Anexo 1.), generando así los diferentes tratamientos y sus repeticiones. Se utilizó una frecuencia de inmersión de un minuto tres

veces al día, siguiendo experiencias previas, obtenidas en los laboratorios de Biotecnología del CATIE. Para determinar el peso de los inóculos se utilizó una balanza analítica marca Delta Ranger – Mettler PE 360. Se establecieron 9 tratamientos testigos, con 60 embriones por sistema, para cada cultivar. Estos fueron colocados en cajas Petri con medio de cultivo Ma<sub>4</sub> semi-sólido (2.5 g de Phytigel). Esta fase tuvo una duración de mes y medio con cambios de medio cada 15 días.

La evaluación de la capacidad germinativa se hizo en términos de cantidad y calidad de los embriones presentes en la muestra. La determinación del incremento del material se realizó a través de la medición de la biomasa total del bioreactor; para lo cual se llevó a cabo una medición inicial, partiendo del inóculo y una medición final total de la biomasa presente en cada recipiente.

Se tomaron tres muestras de 0.5 g por cada recipiente para evaluar el número de embriones presentes en cada tratamiento. Estos fueron clasificados según sus características en cinco grupos: los embriones germinados (EG), los embriones no germinados (ENG), los embriones que presentaron sólo un desarrollo de la radícula, los que presentaron desarrollo de la plúmula, ambos denominados embriones emergidos (EE) y la presencia de callos. Además se determinó el peso fresco (PF) y el peso seco (PS), en gramos y el porcentaje del contenido de agua (%CA) de los embriones obtenidos. Cada muestra fue pesada, en términos del peso fresco, y posteriormente secada a 40°C hasta obtener un peso constante a 38°C, para así determinar el peso seco. El porcentaje del contenido de agua se estimó a través de la fórmula del %CA\*. Además se realizó una descripción de las anomalías morfológicas que presentaban los embriones germinados de ambos cultivares.

De esta manera se determinó la cantidad y el porcentaje de embriones de buena calidad, para establecer la densidad de inóculo más efectiva en cada cultivar y en cada recipiente para inmersión temporal.

### **3.3.3 Estudio de la fase de desarrollo de las plántulas**

La fase de desarrollo consistió en determinar el crecimiento de las plántulas de cada cultivar de *Musa* en los diferentes tratamientos, hasta alcanzar individuos con un tamaño adecuado para ser transferidos a la fase de aclimatación. Los tratamientos se mantuvieron en los mismos recipientes y el medio de cultivo utilizado fue el Ma<sub>5</sub>, por

espacio de dos meses y medio. Los tratamientos testigo fueron divididos en 12 frascos Gerber grandes, con 5 embriones germinados por frascos, en medio semi-sólido Ma<sub>5</sub>.

En esta fase se evaluó la conversión de embriones en plantas, con base en incremento de la longitud durante dos meses y medio de cultivo. La calidad de los embriones fue determinada por una buena emergencia de la plúmula y la radícula (Grapin *et al.* 2000). Posteriormente, se tomaron 30 plántulas al azar por cada tratamiento y se les realizó una caracterización morfológica, con base en las siguientes características: longitud (cm), PF (g), PS (g), %CA, número de hojas, etiolación, hiperhidricidad, presencia de malformaciones y desarrollo de raíces. También se realizó una evaluación del material por estrato horizontal, para la cual se hizo una división de los recipientes en tres estratos, cada uno con una altura de 1.5- 2.5 cm. De cada estrato se extrajo una muestra de 1.8 g, tratando que ésta fuera al azar y representativa del estrato. En este caso se evaluó: PF (g), PS (g) y número de individuos presentes en cada muestra, con el objetivo de ampliar criterios que expliquen los resultados obtenidos y determinar las relaciones de competencia del cultivar en términos de luz, espacio y nutrientes.

#### **3.3.4 Estudio de las plantas en la fase de aclimatación**

Durante esta fase se tomaron los tratamientos con un número mayor de 60 plántulas bien formadas, para evaluar el impacto del proceso de aclimatación en cuanto al porcentaje de éxito y el crecimiento de las plantas. Se cultivaron 30 plántulas en bandejas de plástico con 98 espacios redondos, en un sustrato de 1 parte de tierra y 3 de fibra de coco, mantenidas bajo riego por aspersion a una frecuencia de dos veces al día por 3 minutos. A los ocho días de transplantadas, se les agregó el fertilizante granular de difusión lenta Osmocote 19-6-10 y el fertilizante foliar 10:30:10 una vez por semana, para que desarrollen un buen sistema radical.

A estas plántulas se les midió durante cuatro semanas la longitud inicial y se les contó el número de hojas para ver su crecimiento en un mes. También se tomaron cuatro muestras de hojas por tratamiento evaluado y se les realizó una réplica con esmalte transparente de la huella de la epidermis abaxial y adaxial. A cada réplica se le practicó cuatro lecturas de los estomas encontrados en 10 conteos, usando el microscopio de luz en el campo óptico de 25x. Esta evaluación se realizó sobre hojas tomadas al azar antes y después de un mes de ser plantadas, para determinar el desarrollo morfológico de los tejidos foliar durante las fases de germinación, de desarrollo y aclimatación.

Asimismo, se tomó una muestra histológica de las hojas antes y después del mes de aclimatación, para determinar posibles diferencias en el tejido foliar de las plántulas evaluadas.

### **3.3.5 Histología de las hojas de las plantas**

El estudio histológico se realizó en el Laboratorio de Histología de los Laboratorios de Biotecnología del CATIE. Se procesaron muestras de las hojas de plántulas obtenidas en la fase de desarrollo para las tres metodologías empleadas antes de ser puestas en aclimatación y un mes después de la siembra. Las muestras se fijaron en F.A.A. durante 48 horas y seguidamente se colocaron en una cámara al vacío durante 15 minutos con el fin de extraer las burbujas de aire. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en una serie ascendente de alcohol (50, 60, 80, 90, 95, 100 y 100%), una hora en cada uno de ellos y después se infiltraron en resina Technovit®. Luego se prepararon los bloques con 15 ml de la solución de resina usada en la infiltración y se adicionó 1 ml de la solución endurecedora Technovit®. Los bloques se colocaron en un horno a 50°C durante 12 horas. Posteriormente se realizaron cortes transversales de 3-4 micras de grosor con la ayuda de un micrótopo de resina y finalmente se tiñeron en una batería de tinción con PAS (Periodic acid-Schiff) y NBB (Naphthol Blue Black).

## **3.4 ANÁLISIS FINANCIERO**

El análisis financiero de los tres procesos de cultivo utilizados en esta investigación se realizó a través de la recopilación de información acerca de los precios y las cantidades de materiales usados durante cada fase del cultivo.

Dentro de los rubros que se evaluaron están: componentes de los medios de cultivo para cada fase, materiales empleados durante la fase de aclimatación, uso del laboratorio y valor de los recipientes. Dentro del rubro de "uso de laboratorio", se incluyen todos los gastos en luz, agua e instrumentación empleada durante todo el tiempo en que duró el experimento. El costo que se fijó es el establecido por el Laboratorio de Biotecnología del CATIE, para dar asesorías.

Se obtuvieron los gastos del proceso total, por cultivar, por inóculo y por recipiente de inmersión temporal usado (Nalgen® y RITA©) y el tratamiento testigo en medio semi-sólido. También se contó con los datos por plántula para los mismos ítems.



Los costos fueron evaluados bajo el criterio económico de costo/beneficio (c/b) con el número estimado de plántulas, obtenido de la extrapolación del peso de las plántulas muestreadas, por el peso total de cada recipiente, durante la fase de desarrollo. Para el tratamiento testigo (medio semi-sólido) se llevó a cabo un conteo total de las plántulas obtenidas.

También se realizó el conteo de las plántulas presentes en un recipiente de cada cultivar, inóculo y recipiente usado y se obtuvo la relación c/b. Esto se llevó a cabo con el fin de mostrar un valor cercano al real de una plántula desarrollada en cada tipo de recipiente para este trabajo. Asimismo se toma debe aclarar que los protocolos de regeneración vía embriogénesis somática en *Musa* en inmersión temporal, aún no están ajustados, ni en tiempo ni en concentraciones de reguladores de crecimiento.

### **3.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

#### **3.5.1 Variables estudiadas**

El estudio implica la evaluación de tres variables: el recipiente de cultivo utilizado, el cultivar de *Musa* y la densidad del inóculo (Cuadro 1, Anexo 1). Como parámetros de evaluación se usarán:

- i. Cantidad de biomasa*
  - *Biomasa total en el bioreactor (g)*: se determinó durante las fases de germinación y desarrollo, por la diferencia de peso entre el peso del tratamiento (recipiente y material, sin medio), y el del recipiente (limpio y autoclavado).
  - *Biomasa de callo (g)*,: durante la evaluación de la fase de germinación se realizó un muestreo y una estimación del peso fresco de callos presente en cada tratamiento
  - *Biomasa de embriones (g)*: este valor fue obtenido por muestreo y posterior estimación del peso fresco de embriones presentes en cada tratamiento durante la evaluación de la fase de germinación y de desarrollo.
  - *Biomasa de plántulas (g)*: para la fase de desarrollo se llevó a cabo un muestreo, seguido de una extrapolación, para obtener el peso esperado por relación de pesos.

## **ii Calidad de los embriones obtenidos**

- *Número de embriones totales:* durante la fase de germinación se realizó un conteo de los embriones totales.
- *Frecuencia de embriones morfológicamente conformes:* se determinó la proporción del número de embriones germinados que presentaron un buen desarrollo de la primera hoja con relación al número de embriones totales, de los embriones no germinados y de los embriones emergidos, aquellos que presentaron la emergencia sólo de la plúmula o de la radícula. El cálculo se realizó usando la siguiente fórmula

$$\text{Frec. embriones} = \frac{\text{N}^\circ \text{ embriones con morfología conforme}}{\text{N}^\circ \text{ de embriones totales}} \times 100$$

### **3.5.2 Modelo Matemático**

Para el análisis estadístico se aplicó un diseño irrestricto al azar (DIA) con un arreglo factorial (2x3x3), con tres repeticiones. El diseño establece 18 tratamientos (Cuadro 2, Anexo 1.) con un total de 54 grados de libertad. El modelo estadístico propuesto es:

$$Y_{ijk} = \mu + B_i + C_j + D_k + BC_{ij} + CD_{jk} + BD_{ik} + BCD_{ijk} + \epsilon_{ijk}$$

$\mu$  = media general

$B_i$  = efecto de la metodología aplicada

$C_j$  = efecto principal del cultivar

$D_k$  = efecto principal de la densidad de inóculo

$BC_{ij}$  = interacción de la metodología  $i$  y el cultivar  $j$

$CD_{jk}$  = interacción del cultivar  $j$  y la densidad del inóculo  $k$

$BD_{ik}$  = interacción de la metodología aplicada  $i$  y la densidad del inóculo  $k$

$BCD_{ijk}$  = interacción de la metodología aplicada  $i$ , el cultivar usado  $j$  y la densidad del inóculo  $k$

$\epsilon_{ijk}$  = error experimental

## Distribución de los grados de libertad

$B_i =$	2
$C_j =$	1
$D_k =$	2
$B_{cij} =$	2
$BD_{ik} =$	4
$CD_{jk} =$	2
$BCD_{ijk} =$	4
$\epsilon_{ijk} =$	36
Total =	53

Los datos obtenidos fueron evaluados con AMOVAS y ANDEVAS. Debido a la naturaleza desbalanceada de los datos, se usó el error tipo III y una probabilidad mínima de 0.05 y de 0.01, para la prueba de Duncan.

En el análisis de los datos obtenidos en la fase de multiplicación se usó una ANDEVA para evaluar las diferencias en el volumen de la curva de crecimiento entre las suspensiones celulares embriogénicas de los cv. 'Curraré' y 'Dátil'. Además se usaron gráficas que mostraban el aumento del volumen de las suspensiones celulares embriogénicas en el tiempo. Para la calidad de las mismas se determinó la cantidad de los diferentes tipos de células encontradas en las muestras evaluadas y se les aplicó una ANDEVA para determinar diferencias estadísticamente significativas. Para la fase de germinación se usó una ANDEVA que permitiera evaluar el efecto que tienen las diferentes variables por separado y entre sí, para comparar los tratamientos. También se aplicó una prueba de Duncan que permitiera determinar cuales fueron los mejores tratamientos evaluados según las variables propuestas.

La evaluación estadística de la fase de desarrollo se determinó con una ANOVA y dos ANDEVAS. La ANOVA se aplicó para determinar el desarrollo de las plántulas según las variables evaluadas entre ambos cultivares, los recipientes y los diferentes inóculos. De las ANDEVAS, la primera se usó para valorar las variables según los estratos establecidos y la segunda para determinar las diferencias en la cantidad de estomas para cada tratamiento. De igual manera se realizaron prueba de Duncan, que permitieron determinar cuales fueron los mejores tratamientos. En la fase de aclimatación se utilizó una ANDEVA para determinar cual de los tratamientos seleccionados presenta un mejor rendimiento y crecimiento.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 FASE DE MULTIPLICACIÓN DE LAS SCE

Como parte del trabajo previo para establecer el tamaño del inóculo a utilizar en los ensayos de inmersión temporal, se llevó a cabo la evaluación de la cantidad y calidad de las suspensiones celulares embriogénicas usadas. El trabajo consistió en determinar la uniformidad de las mismas, para así contar con un material homogéneo.

#### 4.1.1 Tasa de Multiplicación de las SCE

Según Grapin *et al.* (1998), el aumento del volumen celular de las SCE se debe al crecimiento y a la fragmentación de los agregados celulares; así mismo ellos observaron que la tasa multiplicativa fue de 2 a 6 su volumen inicial por mes.

En este estudio las SCE de los cv. 'Curraré' y 'Dátil' mostraron un adecuado crecimiento durante los 36 días en que fueron evaluadas. Las curvas de crecimiento de ambos cultivares (Figura 2.) muestran una forma sigmoidea, siendo el comportamiento típico en suspensiones celulares (Pérez *et al.* 1999). A partir del día 8 se observa, en los dos cultivares, un aumento exponencial en el crecimiento. No obstante para el cv. 'Curraré' se presenta una desaceleración del crecimiento cerca del día 30. Es importante hacer notar que, durante el periodo de multiplicación celular, la curva de crecimiento del cv. 'Dátil' más bien se observa un crecimiento lento hasta el día 20. Estas diferencias entre las tasas de multiplicación de las SCE evaluadas se refuerzan con los resultados del ANDEVA aplicado, el cual indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas.

Este factor puede haber incidido en el posterior comportamiento de los embriones del cv. 'Dátil'. Razones como lo son el manejo del material y ajuste del sistema, en términos del tiempo y las concentraciones de reguladores de crecimiento; la edad fisiológica de la suspensión, (Pérez *et al.* 2000), además del estrés de la SCE, etc.; pudieron haber provocado un efecto directo sobre la cantidad, la calidad o la capacidad regenerativa de los embriones.

Otro hecho interesante de resaltar es que ambas suspensiones presentaron una etapa de estrés o re-adaptación durante el cambio de medio (Ma<sub>2</sub>), que se evidenció en la regeneración de los embriones durante los plateos, en Ma<sub>3</sub>. En aquellos plateos, realizados durante los días sin cambio de medio, se observó un buen desarrollo de los

embriones; mientras los que coincidieron con el subcultivo mostraron una menor cantidad de embriones en estado globular y con la muesca bien formada. Esto refleja una posible disminución de la capacidad regenerativa del material.

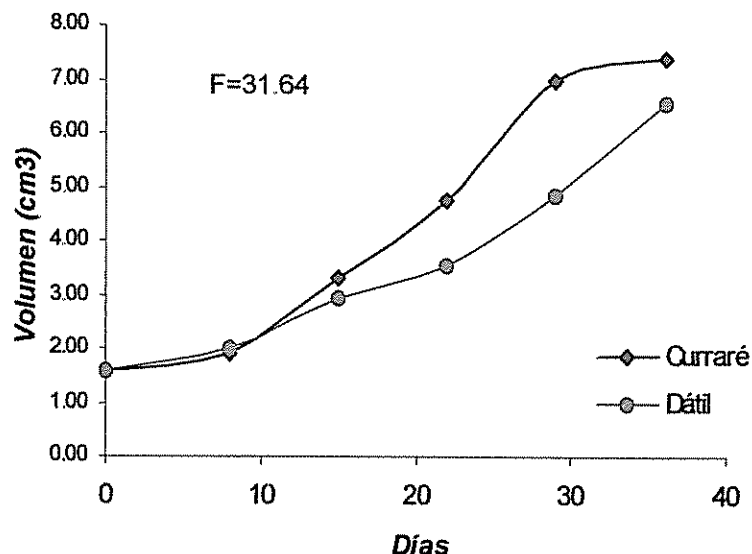


Figura 2. Curva de crecimiento de suspensiones celulares embriogénicas de los cv. 'Curraré' y 'Dátil', durante 36 días de evaluación.

Aunque el crecimiento de ambas suspensiones celulares embriogénicas mostró una evolución normal del material, la capacidad multiplicativa del mismo no puede ser determinada únicamente en estos términos, sino que es necesario realizar evaluaciones al microscopio de los componentes de la suspensión (agregados celulares, células llenas y células vacías) para establecer la calidad de la SCE.

#### 4.1.2 Calidad de las SCE

La calidad de las suspensiones celulares usadas se evaluó en el tiempo en términos del tipo de células encontradas, tomando en cuenta los agregados celulares, las células llenas y las células vacías; para así determinar si la suspensión guardaba una cantidad suficiente de células con potencial embriogénico. Las muestras fueron tomadas cada ocho días por cuatro semanas, a partir del establecimiento de las SCE.

En las SCE de los dos cultivares de estudio, se observó células individuales redondas (células llenas) con un citoplasma denso, conteniendo pequeños gránulos de almidón y proteínas (Figura 3a.), un núcleo bien definido y paredes primarias propias de células no diferenciadas, que podrían ser proembriónicas. Resultados similares fueron presentados

por Megía *et al.* (1993); Georget *et al.* 2000; Lerma *et al.* (2002); Gómez-Kosky *et al.* (2002). Además, se presentaron células individuales alargadas con espacios vacíos en su citoplasma y grandes cantidades de gránulos de almidón (Figura 3c.), observadas también por Bieberach (1995) en su trabajo con varios cultivares de *Musa*. Asimismo, se observó gran cantidad de células vacías, que no aportan a la capacidad regenerativa de la suspensión celular por considerarse desechos (Figura 3d.).

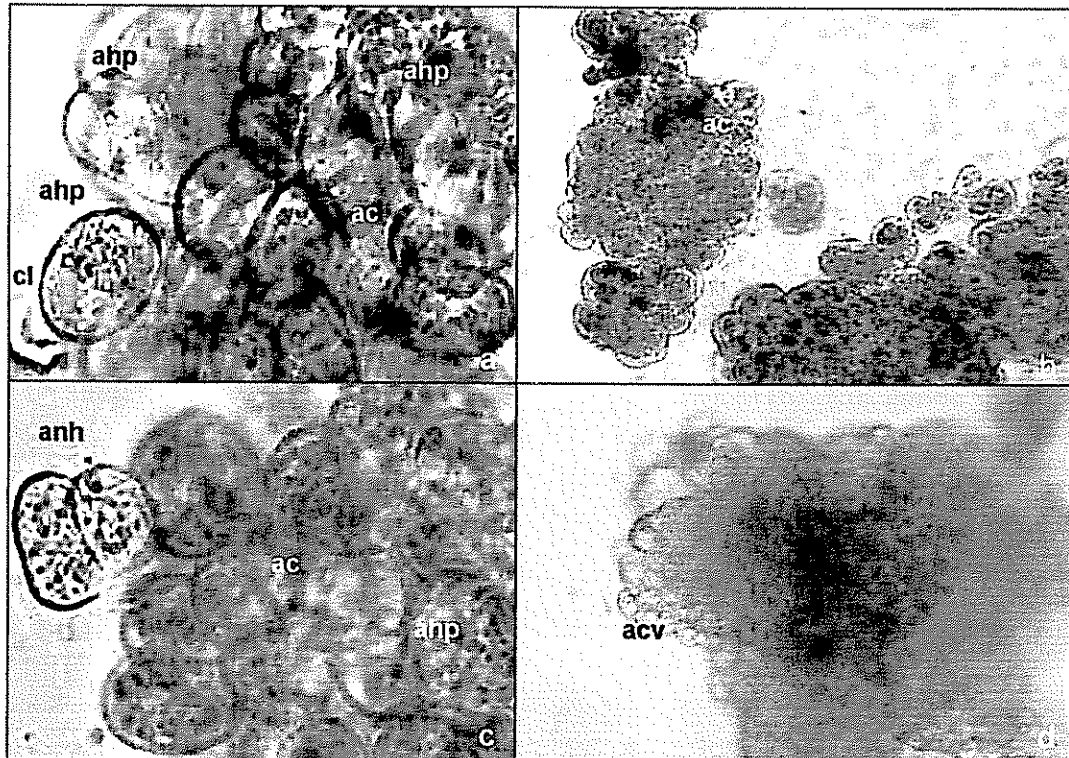


Figura 3. a. SCE del cv 'Curraré' (10x) mostrando células libre (cl) con almidón hidrolizable y proteínas (ahp) y agregados celulares conteniendo células con almidón hidrolizable y proteínas (ahp). b. SCE del cv. 'Curraré' (25x) indicando agregados celulares (ac) grandes pequeños. Se notan algunas células diferenciadas. c. SCE del cv. 'Dátil' (10x) mostrando agregados celulares (ac) con contenido de almidón no hidrolizable (anh) y otras secciones de los agregados celulares con almidón hidrolizable y proteínas (ahp). d. SCE del cv. 'Dátil' (25x) mostrando agregados celulares con células vacías (acv).

Además, se encuentran grupos celulares formando agregados de diferentes tamaños, compuestos por células con potencial regenerativo (Figura 3b.). Dichos agregados presentan una alta diversidad de células proembrionicas, células embriogénicas con reservas de almidón y proteínas y otras células en proceso de diferenciación, como lo indica el trabajo de Georget *et al.* (2000). Resultados similares fueron presentados por Megía *et al.* (1993), Lerma *et al.* (2002), en sus investigaciones en *Musa*.

Así mismo, se puede observar la calidad de los agregados celulares de las SCE de los cultivares 'Curraré' (Figura 3a.) y 'Dátil' (Figura 3b.). En el cv. 'Curraré' se aprecia células con citoplasma claro y con pocos gránulos de almidón, que en su mayoría son brillantes; mientras que en el cv. 'Dátil' se observa que algunas células contienen en su citoplasma celular mayor cantidad de puntos negros. Estos asemejan gránulos de almidón muy compactos, con poca oportunidad de hidrolizarse (Megía *et al.* 1993), lo que significa que son agregados en proceso de degeneración (Bieberach 1995). Esto vendría a reforzar la idea de que los agregados celulares del cv. 'Dátil' son grandes pero están llenos de células diferenciadas que aportan poco a la capacidad regenerativa del material. Por lo tanto y a pesar de que el volumen promedio en agregados celulares presente en las muestras del cv. 'Dátil' fue similar a los resultados documentados, la calidad celular de las suspensiones viene a definir la el potencial embriogénico del material (Lerma *et al.* 2002).

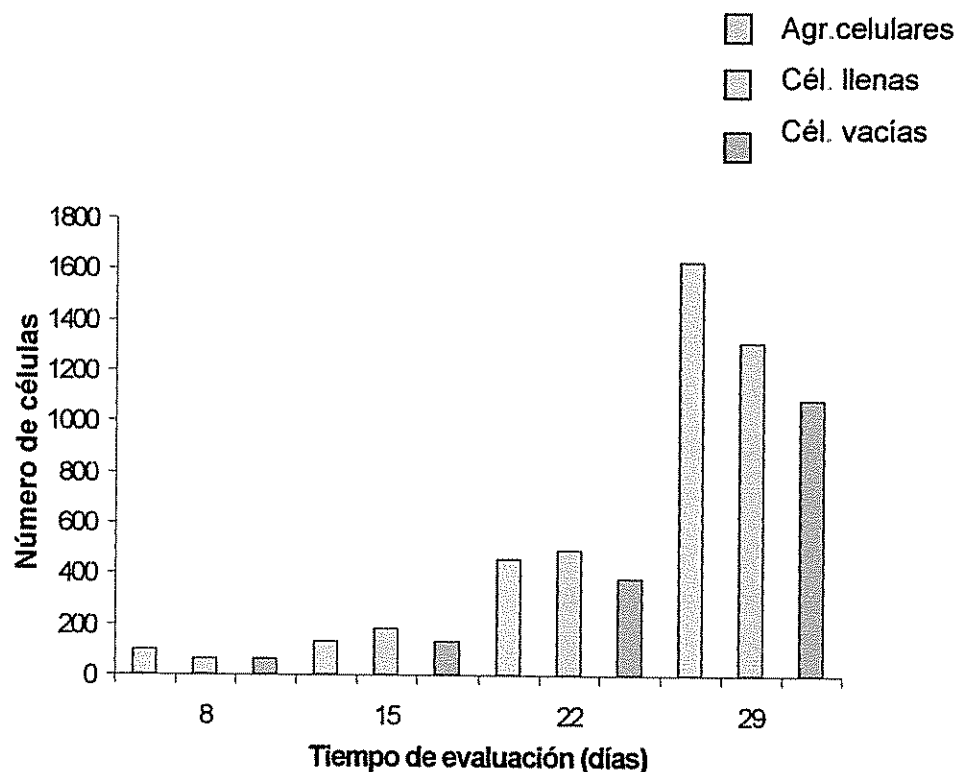


Figura 4. Promedios de los diferentes tipos celulares evaluados en la SCE del cv. 'Curraré', durante cuatro semanas de evaluación en la fase de multiplicación.

Suponemos que el comportamiento de esta suspensión, pudo deberse a un desajuste en el tiempo de regeneración, posiblemente relacionado a condiciones de estrés, lo cual provocó un retraso en su edad fisiológica. De haberse dado un periodo mayor en la fase

de regeneración, posiblemente los embriones hubieran podido germinar y madurar en beneficio de su desarrollo.

En la Figura 4. se observa la evolución del crecimiento y desarrollo celular de la SCE del cv. 'Curraré' durante cuatro semanas de subcultivo. El conteo de los diferentes tipos de células muestra un crecimiento lento durante las tres primeras semanas. En la primera semana predominan los agregados celulares, mientras que en la segunda y tercera semana se observa mayor cantidad de células individuales llenas. Aunque se observa un incremento de células vacías, en el curso de la evolución de la SCE, el número promedio de las mismas siempre es inferior al de los otros tipos celulares. El incremento en el número de células individuales puede deberse a la continua agitación del material que estimula la segregación de los pequeños agregados celulares (Pérez *et al.* 1999). Es importante recordar que antes de iniciar el proceso de regeneración de las SCE, éstas fueron filtradas en un tamiz de 800  $\mu$ , por lo que se contaba con agregados celulares pequeños (Figura 3d.).

El aumento de la cantidad de agregados y células llenas está ligado a la fase de crecimiento exponencial de la suspensión celular embriogénica (Figura 2). La cantidad de células vacías presentes no es significativa, lo cual puede indicar el desarrollo de una suspensión celular de buena calidad.

Para la cuarta semana se observó un aumento exponencial del volumen de la SCE, con una mayor cantidad de agregados, cercana al 55.5% del volumen promedio de las muestras. Este resultado es mucho menor al determinado por Grapin (1996) en el cv. 'French sombre' y por Lerma *et al.* (2002) en el cv. 'Gran Enano', en los cuales los agregados celulares representan entre el 70 y el 80% del volumen de la suspensión celular embriogénica y el obtenido por Gómez-Kosky *et al.* (2000), quienes observaron en el híbrido FHIA-18 que los agregados celulares constituían entre un 80 y un 90% del volumen total de la suspensión. Esta diferencia puede deberse a efectos intrínsecos del genoma del cultivar; o bien, simplemente a la metodología empleada en el conteo.

En el cv. 'Dátil' (Figura 5.) también se estableció la cinética del desarrollo celular similar al realizado para el cv. 'Curraré'. El número de agregados presentes durante las cuatro lecturas siempre fue mucho mayor en relación con los otros tipos celulares y la cantidad de células vacías fue baja, principalmente en las dos primeras semanas de evolución. Estos resultados confirman lo mencionado en la sección 4.1.1 denotando diferencias en



las SCE de ambos cultivares, tanto en el incremento de masa celular como en la proporción de los diferentes tipos celulares presentes.

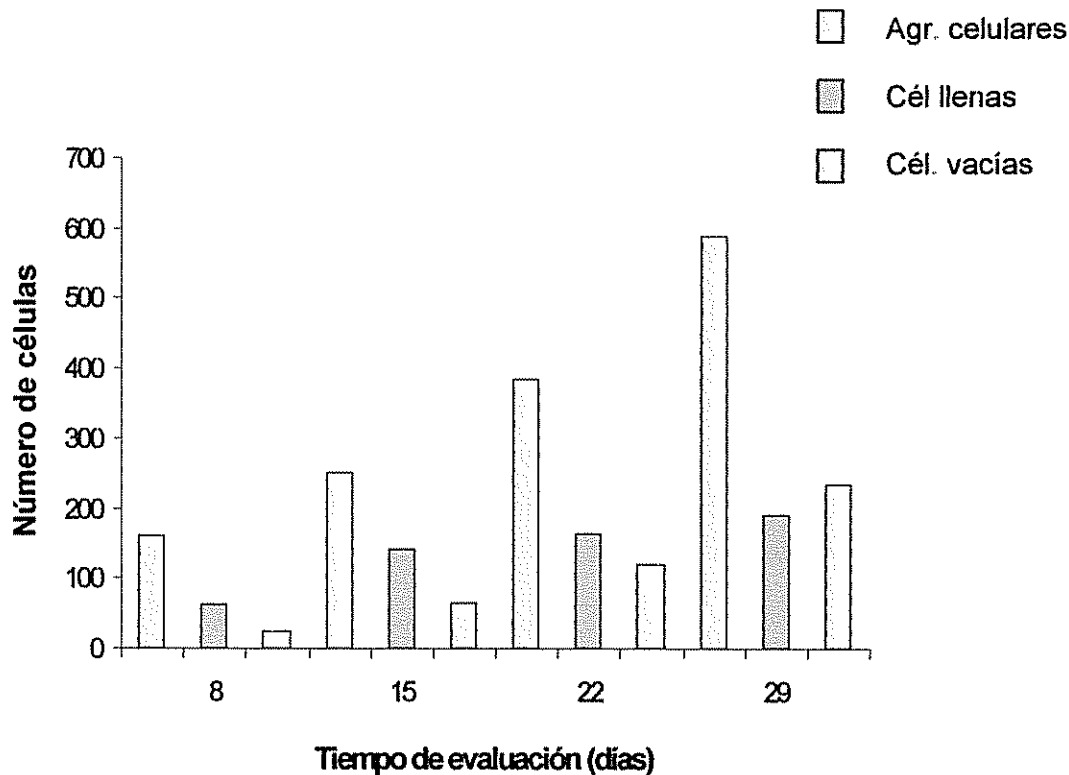


Figura 5. Promedios de los diferentes tipos celulares evaluados en la SCE del cv. 'Dátil', durante cuatro semanas de evaluación en la fase de multiplicación.

La cantidad de agregados celulares en este cultivar es marcadamente menor al evaluado en el cv. 'Curraré'. Esto se debe a que el tamaño de los agregados celulares en el cv. 'Dátil' suele ser mayor que los del cv. 'Curraré', a pesar de que ambas SCE fueron tamizadas antes de iniciar la curva celular de crecimiento.

Este hecho podría usarse como evidencia que justifique la ausencia de una fase de crecimiento exponencial bien establecida en la suspensión celular del cv. 'Dátil', ya que se indica que los agregados pueden aumentar su tamaño, pero al no fraccionarse no se da la liberación de pequeños agregados que mantengan su capacidad meristemática y sigan el desarrollo de la suspensión celular. Además, al mantenerse unidas las grandes masas celulares podrían sufrir de un fenómeno masivo de diferenciación por efecto de las células vecinas y ricas en almidón, que no se liberan. De esta manera se disminuye el crecimiento y por ende la capacidad regenerativa de la suspensión (Grapin *et al.* 1998).

Sin embargo no se registran estudios específicos acerca de este fenómeno. No obstante, el volumen promedio en agregados celulares alcanzó un valor cercano al 75%, valor que entra en el rango obtenido por Lerma *et al.* (2002) y Grapin *et al.* (1996), indicando una buena condición multiplicativa de esta suspensión celular (Lerma *et al.* 2002).

#### 4.2 FASE DE REGENERACIÓN DE LAS SCE

Durante esta fase se observó la presencia de embriones en estado globular con muesca bien formada, en un periodo de seis semanas. En la Figura 6. se puede observar que el porcentaje de embriones con muesca tuvo un aumento exponencial para ambos cultivares. Los porcentajes indican una buena capacidad regenerativa del material, con valores mayores del 70-80% para la cuarta semana de cultivo. Este criterio se usó para considerar el material viable para la fase de germinación. Sin embargo, el material se dejó dos semanas más para garantizar la mayor cantidad de embriones que presentarán las características ideales.

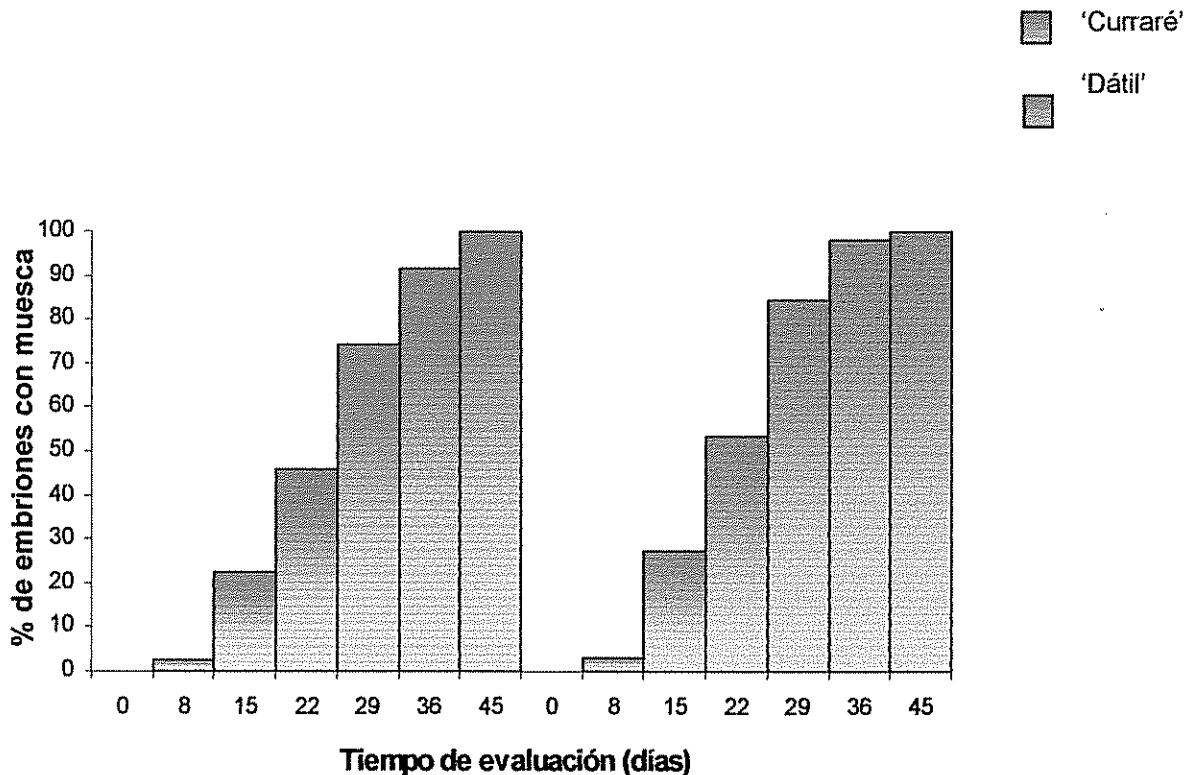


Figura 6. Porcentajes de embriones somáticos en estado globular y con muesca bien formada en los cvs. 'Curraré' y 'Dátil', después de diez semanas en la fase de regeneración.

La evolución de los embriones al estado globular se determinó con el desarrollo de una muesca bien formada, antes de ser llevados a la fase de germinación. Según Grapin *et al.* (2000) estas estructuras pueden ser consideradas proembriones globulares, ya que presentan desarrollo de su epidermis, están bien establecidos los polos del eje embrionario (meristema caulinar y radicular) y se presentan bandas provasculares definidas. Además la presencia de la laguna intercelular y de células esféricas alrededor asemejan la estructura cotiledonar de los embriones cigóticos.

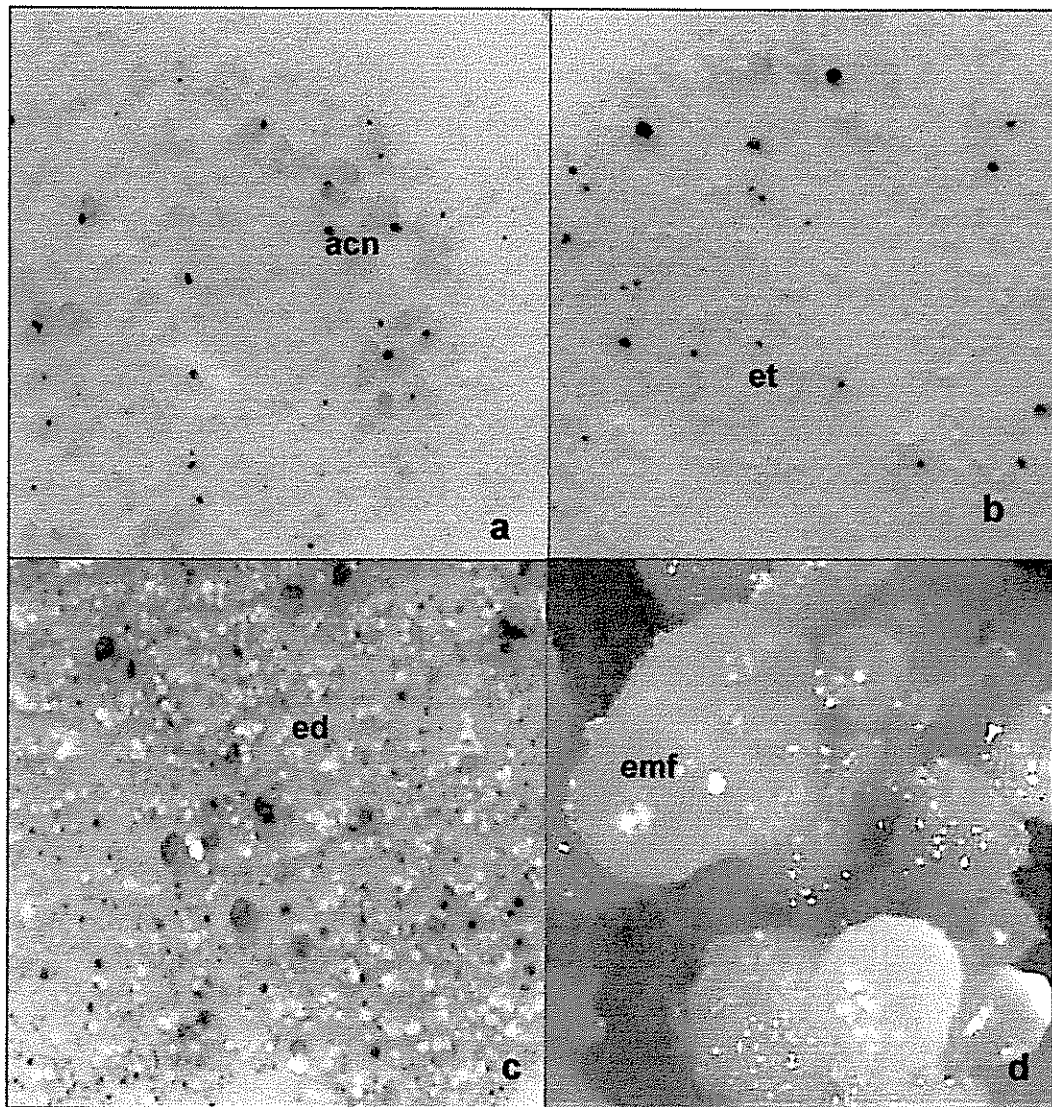


Figura 7. Evolución de la SCE del cv. 'Curraré', durante la fase de regeneración. a. SCE con 22 días de regeneración, mostrando agregados celulares necrotizados (acn) b. SCE a los 45 días, mostrando embriones con desarrollo tempranos (et). c. SCE a los 60 días, mostrando embriones desarrollados (ed). d. Embriones con dos meses y medio de desarrollo, con su muesca bien formada (emf).

La Figura 7. muestra el desarrollo de la SCE del cv. 'Curraré' durante la fase de regeneración en medio semi-sólido  $Ma_3$ . A los 22 días de cultivo (Figura 7a.), el material todavía se encuentra formando cúmulos, posiblemente agregados celulares grandes. También se observó agregados grandes y pequeños, ambos necrotizados. Este fenómeno es típico en este cultivar y puede deberse principalmente a dos factores, primero a un proceso de re-adaptación del material al cambio de un medio líquido al medio semi-sólido, rico en citocininas; o bien, a factores de origen del mismo (Novak *et al.* 1989). Para el día 45 se puede observar que de estos cúmulos brotan estructuras que pueden ser proembriones (Grapin *et al.* 1998) y para el día 60 (Figura 7c.) los embriones están bien definidos, pero no todos han desarrollado la muesca. En la Figura 7d. se observan los embriones con la muesca claramente definida, después de dos meses y medio de cultivo.

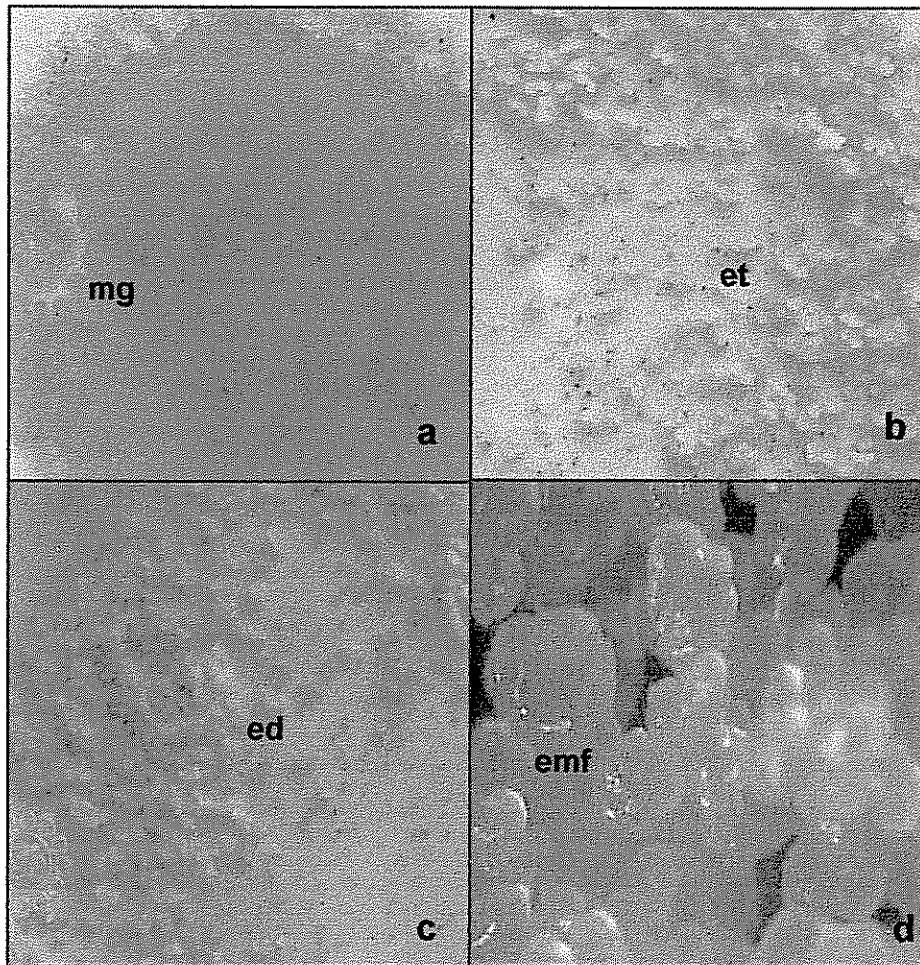


Figura 8. Evolución de la SCE del cv. 'Dátil', durante la fase de regeneración: a. SCE con 22 días de regeneración, mostrando una masa gelatinosa de coloración naranja (mg). b. SCE a los 45 días, mostrando embriones en desarrollo temprano (et). c. SCE a los 60 días, mostrando embriones desarrollados (ed). d. Embriones con dos meses y medio de desarrollo, con su muesca bien formada (emf).

La evolución de la fase de regeneración del material del cv. 'Dátil' (Figura 8.) es diferente a lo observado en el cv. 'Curraré' (Figura 7.). Dentro de los eventos que caracterizan esta diferencia está la formación de una masa gelatinosa a los 22 días de cultivo, en el medio de regeneración (Figura 8a.). Esta formación posiblemente está relacionada con el tamaño de los agregados celulares. Durante este periodo no se observa material necrotizado en la mayoría de los platos Petri, pero es evidente un desarrollo más rápido de los embriones, los cuales presentan un mayor tamaño y están organizados en agregados embriogénicos. Curiosamente se observa en este cultivar una coloración anaranjada, bastante peculiar, no observada en otros cultivares; sin embargo no se cuenta con información al respecto.

Para el día 30 de la masa gelatinosa surgen estructuras proembrionicas y algunas de ellas ya poseen una muesca (Figura 8b.). Al día 45, los embriones ya están bien definidos, casi todos presentan la muesca claramente formada (Figura 8c.). A los dos meses y medio de cultivo, se observan los embriones en estado globular con su muesca bien definida (Figura 8d.).

El crecimiento en agregados de los embriones, posiblemente, afecta la sincronía del proceso embriogénico. Este fenómeno ha sido observado por varios autores, quienes lo denominan embriogénesis somática secundaria. Escalant *et al.* (1994) en su trabajo sobre embriogénesis somática en flores masculinas del cv. 'Gran Enano' (AAA), observó el desarrollo de embriogénesis somática secundaria, empleando la técnica de cultivo inmersión temporal. Gómez- Kosky *et al.* (2000) en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB), se refiere a este fenómeno como una multiplicación en cascada de los embriones, de la cual se obtiene entre 4 y 6 embriones secundarios por cada embrión. Khalil *et al.* (2002) en su trabajo con el cv. 'Dwarf brazilian', define este proceso como la formación de embriones a partir de un embrión pre-existente.

### 4.3 FASE DE GERMINACIÓN

Durante esta fase se evaluó la ganancia en peso fresco (PF), en gramos, obtenida por la diferencia de pesos entre la biomasa inicial y la biomasa final para los tratamientos estudiados, empleando los recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA®) con tres inóculos (0.5, 1.0 y 1.5 g) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido.

En la Figura 10 se muestran los valores del aumento en peso fresco (PF) en gramos, de cada tratamiento evaluado.

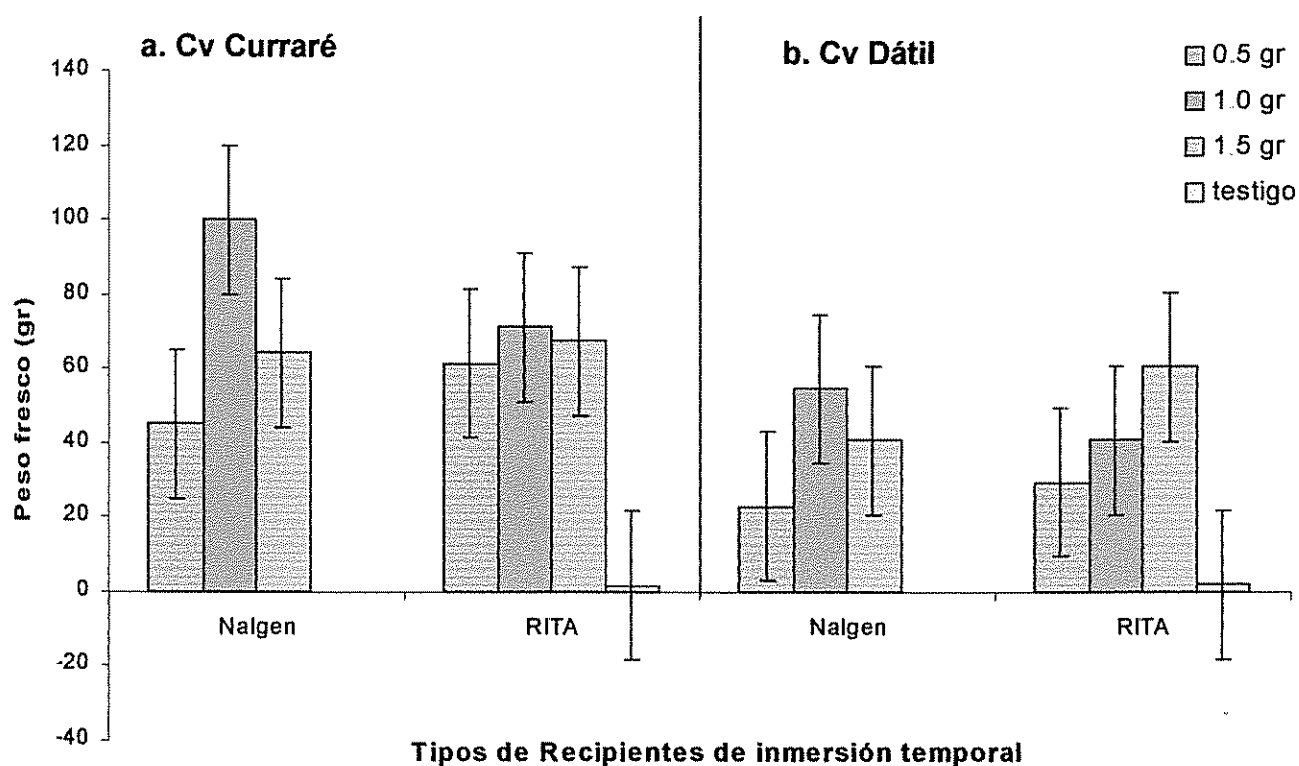


Figura 9. Promedios del peso fresco (PF), en gramos, de los embriones de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' en la fase de germinación bajo cultivo en dos recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA®) y del tratamiento testigo en medio de cultivo semi-sólido, para tres inóculos diferentes (0.5, 1.0 y 1.5 g).

Los valores de peso fresco (PF) para el cv. 'Curraré' son mayores que los del cv. 'Dátil' en todos los tratamientos. Esto puede deberse en parte al hecho de que los embriones del cv. 'Curraré' (Figura 10a y 10b.) presentaron un mayor tamaño y desarrollo que los embriones del cv. 'Dátil' (Figura 10c. y 10d.); o bien que el crecimiento en el cv. 'Curraré' fue más temprano que en el cv. 'Dátil'. Además, muchos de los embriones de este cultivar exhibieron un crecimiento agrupado; posiblemente este fenómeno refleja

embriogénesis secundaria, debido a que se origina de un embrión pre-existente (Khalil *et al.* 2002, Cabbason *et al.* 1997). Esta respuesta del material pudo incidir en el crecimiento de los embriones, ya que aumenta la competencia por espacio, luz y nutrientes, factores que limitan su crecimiento (Alvard *et al.* 1993).

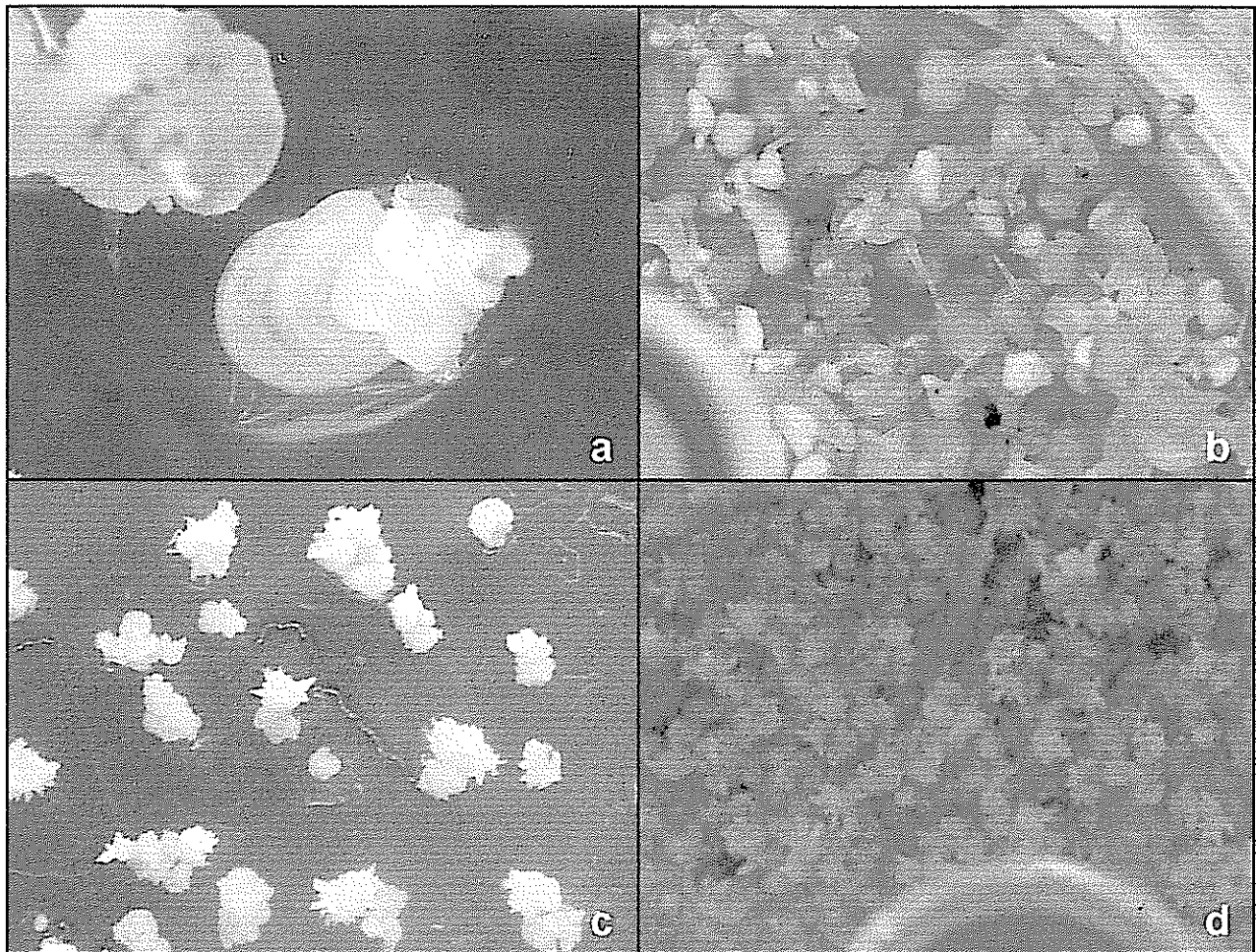


Figura 10. Embriones somáticos de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' en fase de germinación. **a.** Embriones germinados del cv. 'Curraré' en medio semi-sólido **b.** Embriones germinados del cv. 'Curraré' cultivados en recipiente RITA©. **c.** Embriones germinados del cv. 'Dátil', en medio semi-sólido. **d.** Embriones germinados del cv. 'Dátil' en el recipiente RITA©.

Para las metodologías de cultivo utilizadas durante la germinación de los embriones de ambos cultivares (Figuras 10. y 11.), se muestran diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos de inmersión temporal usados y el medio de cultivo semi-sólido (Cuadro 1.). No obstante, entre los recipientes de inmersión temporal RITA© (Figura 11a. Y 11c.) y Nalgen© (Figura 11b. Y 11d.) no muestran diferencias

estadísticamente significativas entre ellos. Posiblemente porque ambos proveen el espacio suficiente y el ambiente físico-químico apropiado para el desarrollo de los embriones durante la fase de germinación. Asimismo, se observó mayor hiperhidricidad en los recipientes de inmersión temporal. Esto puede estar relacionado con la masa de embriones y la humedad presente en los recipientes.

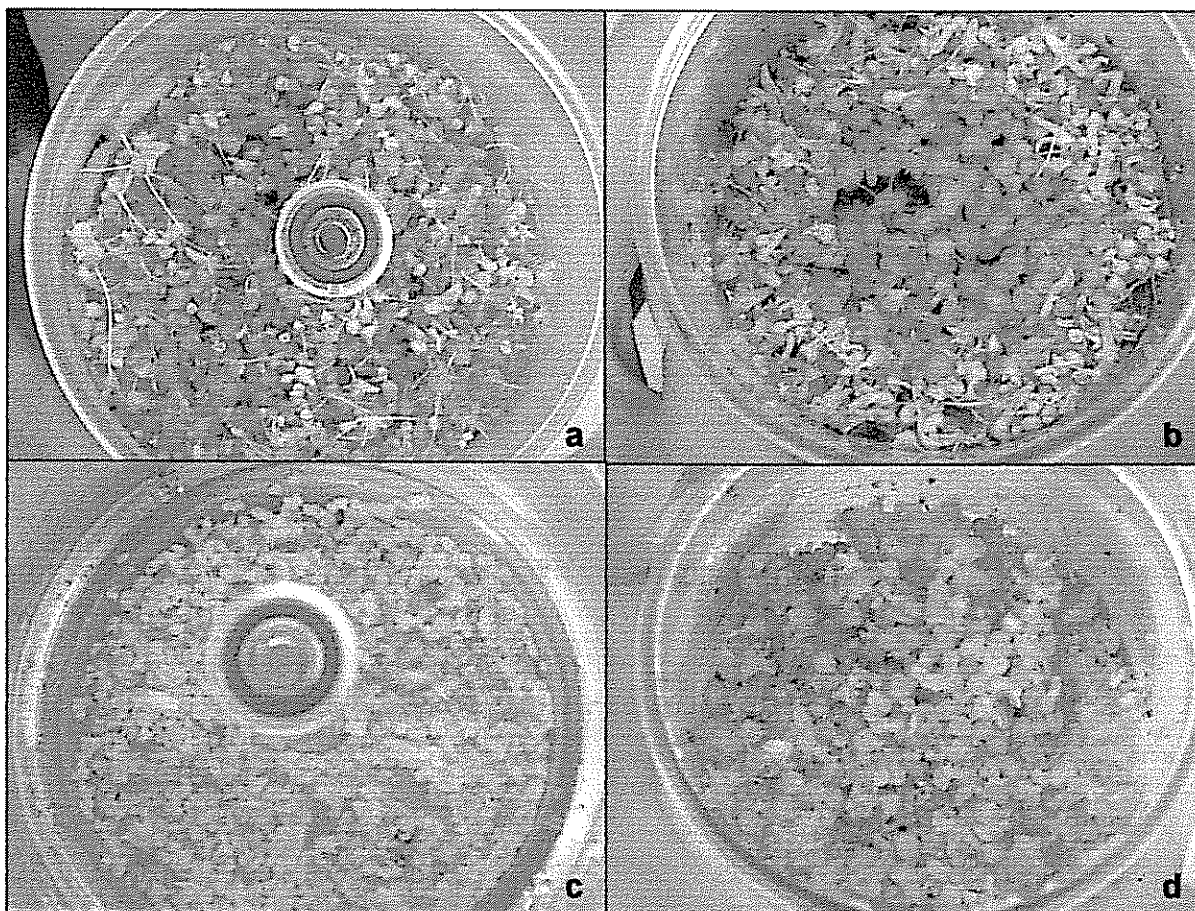


Figura 11. Embriones somáticos de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil', con un mes en germinación en inmersión temporal. a. Embriones del cv. 'Curraré' cultivados en RITA®. b. Embriones del cv. 'Curraré' en Nalgen®. c. Embriones del cv. 'Dátil' cultivados en RITA®. d. Embriones del cv. 'Dátil' en Nalgen® (d).

En relación con el tratamiento testigo, en definitiva no se puede realizar comparaciones en cuanto al aumento en biomasa, porque no se pudo trabajar en las cajas Petri usando los mismos inóculos iniciales (Figura 11a. Y 11c.). Sin embargo, Tisserat y Vandercook (1985) en su trabajo sobre zanahoria y *Phoenix dactylifera* mostraron un aumento en el crecimiento de los embriones de casi el doble de su tamaño en un sistema de cultivo totalmente automatizado en relación con un tratamiento en medio semi-sólido (Etienne y Berthouly 2002).



Cuadro 1. Significancias del peso fresco (PF) final, en gramos, de los diferentes tratamientos evaluados durante la fase de germinación para los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' en los recipientes (Nalgen® y RITA ©) para tres inóculos iniciales de cultivo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido. Se usó la prueba de Duncan con un  $\alpha$  de 0.01.

<b>Cultivar</b>	<b>Promedios</b>	<b>Significancia</b>
Dátil	28.31	b
Curraré	45.93	a
<b>Método de cultivo</b>	<b>Promedios</b>	<b>significancia</b>
Semi-sólido	1.72	b
Nalgen®	54.51	a
RITA ©	55.12	a
<b>Inóculo (g)</b>	<b>Promedios</b>	<b>Significancia</b>
0.5	39.69	b
1.5	58.12	a
1	66.64	a

No obstante, si se observan diferencias estadísticamente significativas al comparar la densidad de siembra para ambos cultivares y recipientes. El mayor incremento en biomasa se mostró para los inóculos de 1.0 y 1.5 g. Sin embargo, este resultado lo que señala es que "a mayor masa inicial, mayor masa final" y que el material crece de manera continua; no obstante esto no está directamente relacionado con el grado de germinación o de sincronización del material, tal cómo puede verse más adelante.

El mayor incremento en biomasa (PF) se observó en el cv. 'Curraré' cuando se utilizó inóculo inicial de 1 g de embriones en el recipiente Nalgen®. Comparativamente el cv. 'Dátil' se muestra el mayor incremento en PF en el recipiente RITA© con el inóculo inicial de 1.5 g de embriones. Como se indicó con anterioridad, no se puede definir a ciencia cierta, cual factor está influyendo en el aumento de biomasa en los diferentes tratamientos para la fase de germinación. Se esperaría obtener una mayor cantidad de embriones germinados y que estos tratamientos generen condiciones ideales de competencia por espacio, luz y nutrientes. Sin embargo, otros factores tales como la humedad presente en los recipientes, pueden estar afectando el peso medido. Además se observó que en aquellos tratamientos que presentaban mayor cantidad de biomasa estaban más húmedos y los embriones más hiperhídricos. Posiblemente la cantidad de humedad influyó en el peso de los embriones, lo cual incidió en el peso de la biomasa total y la calidad de los mismos.

Por los antecedentes valorados en las secciones 4.1 y 4.2 se puede indicar que el incremento en PF del cv. 'Curraré' puede ser concomitante con la calidad de la SCE. Este factor puede estar estrechamente relacionado a un mejor desarrollo y crecimiento de

los embriones del cv. 'Curraré', con relación a los embriones del cv. 'Dátil'. La SCE de 'Dátil' mantuvo un crecimiento lento durante la fase de regeneración y puede que no alcanzara el tiempo óptimo de crecimiento exponencial. Además de que muchos de sus agregados celulares tenían células diferenciadas, lo cual disminuyen el potencial embriogénico de la suspensión. Durante la fase de regeneración el material aún estaba inmaduro y de nuevo el factor tiempo pudo haber incidido que no fuera llevado a la fase de germinación en el mejor estado fisiológico, afectando la evolución de cada una de las etapas del desarrollo embriogénico y la posterior conversión en plantas.

En el Cuadro 2. se muestran los promedios del porcentaje de embriones germinados (EG), embriones no germinados (ENG) y embriones emergidos (EE) obtenidos en la fase de germinación, para ambos cultivares. Los EE representan aquellos embriones que exponen un desarrollo temprano de la plúmula o de la radícula.

Cuadro 2. Porcentajes promedio de embriones germinados (EG), embriones no germinados (ENG) y embriones emergidos (EE) para los cvs. 'Dátil' y 'Curraré' en los recipientes RITA®, Nalgen® con tres inóculos de cultivo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido, durante la fase de germinación

Cultivar	Recipiente	Inóculo (g)	% EG	% ENG	% EE	
Curraré	Nalgen®	0.5	28.69 ± 6.56	23.48 ± 9	47.83 ± 10.6	
		1	35.87 ± 7.23	19.05 ± 22.54	45.08 ± 31.82	
		1.5	27.37 ± 8.08	27.65 ± 14.73	44.97 ± 3.79	
	RITA®	0.5	59.51 ± 20.07	23.48 ± 9.5	17.91 ± 25.3	
		1	42.31 ± 31.19	34.36 ± 77.78	23.33 ± 31.2	
		1.5	12.3 ± 2.65	55.87 ± 159.4	31.84 ± 60.63	
	Semi-sólido	T	89.81 ± 5.92	10.19 ± 5.92	0	
	Dátil	Nalgen®	0.5	11.63 ± 31.214	29.25 ± 31	59.11 ± 129.15
			1	7.44 ± 20.3	37.94 ± 209.73	54.62 ± 259.1
			1.5	1.85 ± 11.36	52.29 ± 86.5	45.86 ± 32.05
RITA®		0.5	2.01 ± 9.61	18.39 ± 27.099	79.6 ± 84.7	
		1	0.56 ± 4.509	20.02 ± 25.16	79.42 ± 154.8	
		1.5	6.47 ± 8.505	32.3 ± 44.68	61.24 ± 31.56	
Semi-sólido		T	22.22 ± 15.45	77.78 ± 15.45	0	

Para ambos cultivares se observan diferencias significativas en el porcentaje de EG, ENG y EE en relación con las variables evaluadas (cultivar, recipiente, inóculo). El porcentaje

de germinación (EG) para los cultivares muestra diferencias significativas (Cuadro 2., Anexo 2.), siendo el valor promedio de germinación ligeramente mayor para el cv. 'Curraré' (Cuadro 3.). Esto indica que, aunque no hay grandes diferencias entre los cultivares, el cv. 'Curraré' presenta una mejor respuesta durante la fase de germinación que el cv. 'Dátil'.

Cuadro 3. Significancias del número de embriones germinados, embriones no germinados y embriones emergidos de los cvs. de 'Curraré' y 'Dátil' en la fase de germinación. Se usó la prueba de Duncan con un  $\alpha$  de 0.01. No se usó el testigo.

	Dátil		Curraré	
	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia
EG	11.39	a	13.41	a
ENG	82.13	a	13.80	b
EE	155.48	a	13.98	b

La respuesta del cv. 'Dátil' en la fase de germinación, indica que el material no fue homogéneo, siendo el tiempo de regeneración el factor determinante. Durante la fase de multiplicación, el material tardó más para llegar a la fase de crecimiento exponencial; es decir, la suspensión celular tuvo un crecimiento más lento, en comparación con el cv. 'Curraré'. Posiblemente esto influyó negativamente en la cantidad de embriones que llegaron al estado globular y que por ende estaban listos para la germinación. Otro factor que puede ser concomitante al tiempo, es un desajuste por parte del cv. 'Dátil' a las concentraciones de los reguladores de crecimiento, ya que no todos los cultivares muestran la misma respuesta al protocolo de crecimiento establecido. La producción de callos embriogénicos en este cultivar se obtiene a concentraciones inferiores de 2,4-D con respecto a las utilizadas en rutina (Datos sin publicar). Sin embargo no se realizaron evaluaciones para comprobar esto. Además, el comportamiento de los cultivares depende de otros factores como los genéticos, epigénicos y fisiológicos (Halperin 1991), algo que no se puede controlar, a pesar de que se inicie el proceso de regeneración con un material en apariencia homogéneo.

Otro aspecto importante de destacar es que tal y como se ha comentado con anterioridad, el cv. 'Dátil' presentó en la fase de regeneración embriones que crecen en agregado, provenientes todos de un mismo embrión. Este fenómeno fue relacionado con la embriogénesis secundaria, la cual ya fue descrita en inmersión temporal para *Citrus* (Cabasson *et al.* 1997) y para dos cultivares de *Musa* (Gómez-Kosky *et al.* 2000; Khalil *et al.* 2002). Además, Etienne y Berthouly (2002), mencionan que la inmersión temporal

promueve la embriogénesis secundaria en las células epidermales de algunos embriones somáticos primarios.

Según Khalil *et al.* (2002), este fenómeno refleja un alto potencial de multiplicación, ya que permite un continuo en la producción de nuevos embriones somáticos. Sin embargo, para los términos de este trabajo, significó un retardo en la germinación y menor sincronía del material en este cultivar. Esto podría indicar una mayor aptitud del cv. 'Dátil' a la embriogénesis somática con respecto al cv. 'Curraré', lo cual significa que será necesario realizar subcultivos periódicos para obtener un mejor rendimiento en la tasa de proliferación de embriones en el cv. 'Dátil'.

Para los porcentajes de EE y ENG, el cv. 'Dátil' presentó promedios más altos (Cuadro 2.). Esto indica que, en efecto, este cultivar presentó una menor tasa de germinación de los embriones. En contraste, el cv. 'Curraré' presenta una mayor cantidad de EG, con un alto porcentaje de emergencia; lo cual puede relacionarse con una mayor tasa de germinación a corto tiempo. Etienne *et al.* (1999), en su trabajo sobre producción en masa de embriones somáticos de *Coffea arabica* en el bioreactor RITA®, indica que a grandes densidades de embriones, se da una inhibición del proceso de germinación, en el cual los embriones se mantienen en estado de torpedo. Esta situación pudo limitar el crecimiento y germinación de embriones, ya que aumenta la competencia por espacio, luz y nutrientes (Novak *et al.* 1989). Además se inhibe la germinación de los embriones, debido a que una mayor cantidad de biomasa puede condicionar la capacidad de los embriones para recibir y responder a las señales de desarrollo (Finstand *et al.* 1993). También, este hecho puede relacionarse con la posible embriogénesis somática secundaria que se presentó en este cultivar, ya que se ha demostrado que una célula puede ser influida por sus vecinas. En general, se contabilizaron más embriones en 'Dátil', pero en su mayoría provenían de un mismo embrión, lo cual ya ha sido documentado por Cabasson *et al.* (1997) y Khalil *et al.* (2002).

Con respecto a la densidad de cultivo se muestran diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 2., Anexo 2.). La prueba de Duncan indica que el porcentaje de embriones germinados es mayor para los inóculos de 0.5 y 1.0 g, en relación con el del inóculo de 1.5 g (Cuadro 4.). Este fenómeno señala que en inóculos de alta densidad, no hay una buena germinación de embriones (Etienne *et al.* 1999); posiblemente porque aumenta la competencia por los recursos y se pueden dar procesos de inhibición en el proceso de germinación (Novak *et al.* 1989).

Cuadro 4. Significancias del número de embriones germinados, embriones no germinados y embriones emergidos para los inóculos usados (0.5, 1.0 y 1.5 g) en la fase de germinación. Se usó la prueba de Duncan con un  $\alpha$  de 0.01. No se usó el testigo.

Inóculo (g)	0.5		1.0		1.5	
	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia
EG	14.17	a	15.5	a	7.53	b
ENG	32.61	b	55.72	a	55.56	a
EE	86.64	b	113.94	a	53.61	c

Se puede concluir que los tratamientos con mejores porcentajes de germinación corresponden al cv. 'Curraré', en el recipiente RITA® con inóculos de 0.5 y 1.0 g. Estos porcentajes se encuentran entre el 59 y 42%; mientras que los porcentajes del cv. 'Dátil' se ubican en el ámbito de 0.56 a 22.2%, indicando valores de germinación muy bajos (Cuadro 2.). Otros autores como Gómez-Kosky *et al.* (2002) obtuvieron porcentajes de 45,5 y 50% de germinación de embriones de FHIA-18, usando el recipiente RITA® con inóculos de 1 y 1.5 g. No obstante, este autor no utilizó el medio líquido propuesto por Ma (1991), sino que usó un medio de cultivo MS suplementado con 0.3 mg/l de 6-BAP y 0.01 mg/l de Biobras-6. Sin embargo, el resultado para el cultivo en RITA® con inóculo de 1.0 g, no es tan diferente al obtenido por el autor. Como se ha comentado anteriormente, los resultados del cv. 'Dátil' están supeditados a los problemas durante la fase de regeneración, pero no así los del cv. 'Curraré'. Posiblemente, será necesario hacer ajustes en el tiempo de cultivo para cada fase, como parte de la optimización del sistema para cada cultivar.

Grabin *et al.* (2000) menciona porcentajes de 73 y 84% de germinación para el cv. 'Curraré', utilizando suspensiones celulares. No obstante las fases de germinación y desarrollo se realizaron en medio de cultivo semi-sólido. Estos resultados pueden servir de referencia, sin embargo no son un parámetro altamente comparativo, ya que el uso de medio líquido confiere condiciones muy diferentes al material. Bieberach (1991), presentó resultados sobre la germinación del cv. 'Dominico' en inmersión temporal usando Nalgen®, pero logró porcentajes muy bajos, debido a la oxidación del material.

Por su parte Etienne *et al.* (1999), en su trabajo en café usando bioreactores RITA® y diferentes densidades de inóculo, obtuvo porcentajes de germinación altos para los inóculos más bajos y menores para los tratamientos de alta densidad de embriones. Esto

indica que el inóculo es un factor a tomar en cuenta para determinar el grado de germinación de embriones somáticos en un sistema de cultivo en inmersión temporal. Partiendo de los datos sobre EG, ENG y EE, se puede estimar el grado de sincronía del material. Para el cv. 'Curraré' se puede indicar una buena sincronía en ambos recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA© ), siendo mejor para el recipiente RITA©, en densidades de cultivo de 0,5 y 1.0 g. Estos datos lo que indican es que se da germinación continua y rápida del material, ya que existe una adecuada proporción de EG y EE, por lo que la germinación completa de los mismos se lograría en un plazo de pocos días (Cuadro 2.). Para el inóculo de 1,5g en Nalgen® se evidencia un crecimiento más lento, en el cual la cantidad de EG y ENG es similar. Además se observa una proporción alta de embriones emergidos, pero el proceso podría estar más orientado a estadios tempranos de la germinación, ya que aún hay gran cantidad de ENG. Para el cv. 'Dátil', se observa muy pocos EG, en ambas metodologías de inmersión temporal. Se puede deducir que el crecimiento es muy lento y el material está en un estado de germinación temprana; sin embargo la germinación podría ser más rápida en el recipiente Nalgen®.

Cabasson *et al.* (1997), en su trabajo sobre regeneración de suspensiones celulares de *Citrus* usando el sistema de inmersión temporal RITA©, observó una mejora en la sincronización de la fase de regeneración, por inhibición de la embriogénesis secundaria. Los resultados obtenidos en este estudio son consecuentes con los obtenidos por estos autores. En el cv. 'Dátil' el desarrollo de la embriogénesis secundaria, generó menor sincronización del sistema. Etienne y Berthouly (2002) recomiendan hacer subcultivos para los cultivares de *Musa* y *Coffea*. Es importante hacer notar que el grado de sincronía del material es relevante para la producción en masa (Etienne *et al.* 1999).

Al comparar los tratamientos testigos, con los tratamientos en los recipientes de inmersión (Cuadro 2.), se observa que para el cv. 'Curraré', la cantidad de EG, obtenidos en el medio de cultivo semi-sólido es alta; lo que significa que el protocolo establecido (Escalant y Teisson 1989) es un proceso muy eficiente. No obstante la producción está limitada a una cantidad de embriones y a un número de recipientes determinado. La idea del sistema de cultivo en inmersión temporal es agilizar y potencializar el proceso de multiplicación. Además, en los recipientes de inmersión temporal, la cantidad de embriones emergidos puede aumentar el número de embriones germinados en un corto tiempo, así que los resultados obtenidos, aunque contundentes no son absolutos. Para el cv. 'Dátil' fue evidente, aún en el testigo, que el material tenía problemas en su proceso

de regeneración, porque también el número de embriones germinados es muy bajo, sobretodo si se tiene en cuenta que se aplicó un protocolo ya establecido. Esto nos lleva a la conclusión de que hay un desajuste en el proceso de regeneración y germinación durante la embriogénesis somática de este cultivar.

#### 4.4 FASE DE DESARROLLO

Durante la fase de desarrollo se siguió con los mismos tratamientos, sin hacer cambio de recipiente, con el objetivo de darle continuidad a todo el proceso de regeneración empleando la metodología de inmersión temporal.

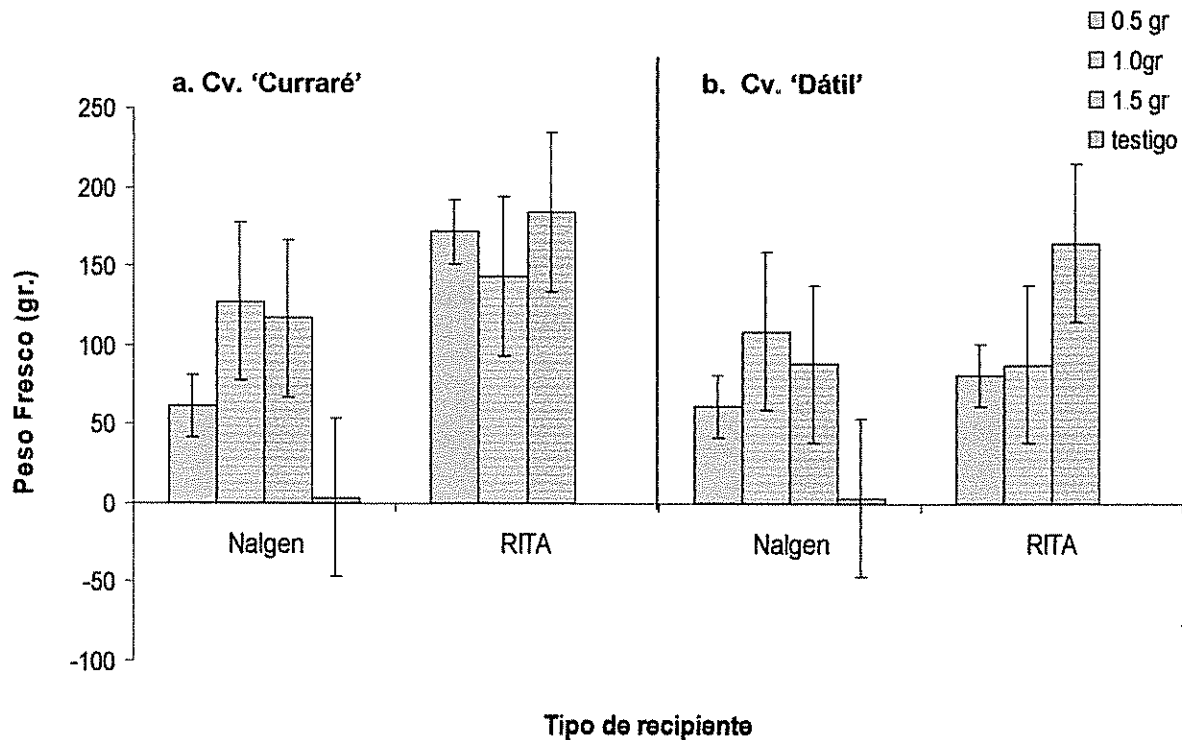


Figura 12. Porcentajes del promedio de peso fresco (PF), en gramos, para la fase de desarrollo de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' en los recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA®) y el testigo (semi-sólido) con los inóculos de 0.5, 1.0 y 1.5 g.

La Figura 12. muestra los porcentajes promedio de la ganancia del peso fresco (PF) durante la fase de desarrollo, después de dos meses y medio de cultivo. Se indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre las variables estudiadas (Cuadro 3., Anexo 2).

Se puede observar que los mejores resultados los obtuvo el recipiente RITA®, con el inóculo inicial de 1.5 g, para ambos cultivares. Este resultado está ampliamente relacionado con el tamaño del recipiente, el cual brinda mayor espacio para que se desarrollen los embriones y las plántulas, reduciendo la competencia por recursos (Novak *et al.* 1989). También se observa que en ambos cultivares, para el recipiente Nalgen®, el mayor incremento en biomasa se obtuvo a una densidad inicial de 1.0 g. Sin embargo es importante definir los componentes de la biomasa presente en el recipiente de cultivo al tiempo de evaluación, con relación a la proporción de plántulas, embriones germinados (EG), embriones no germinados (ENG) y embriones emergidos (EE). Esto con el fin de seleccionar el recipiente de cultivo que presente un adecuado desarrollo de embriones.

En el Cuadro 5. se muestra el número promedio de plántulas en una muestra de 5.4 g, obtenida en cada recipiente de inmersión temporal.

Cuadro 5. Número de plántulas estimado, número de plántulas obtenidas y el peso de las plántulas para los cvs. de 'Curraré' y 'Dátil', en los dos recipientes (Nalgen® y RITA®) y tres inóculos (0.5, 1.0 y 1.5 g).

Cultivar	Recipiente	Inóculo (g.)	N° promedio de plántulas por muestra	Peso promedio de 1 plántula (g)	N° de plántulas estimado	N° de plántulas obtenido
Curraré	Nalgen	0.5	24.5	0.19	326.7	369
		1	58.5	0.08	1581.4	532
		1.5	41.7	0.11	1111.9	653
	RITA	0.5	30	0.04	3934.2	298
		1	30.3	0.03	5183.5	517
		1.5	9	0.04	5164.3	597
Dátil	Nalgen	0.5	26.5	0.06	953.8	54
		1	6.5	0.09	1160.2	30
		1.5	0	0.0	0	33
	RITA	0.5	12	0.07	1099.2	32
		1	4	0.09	970.0	27
		1.5	2	0.09	1915.1	20

El mayor número de plántulas fue obtenido en el cv. 'Curraré'. Esto indica que este cultivar tuvo una mejor respuesta al cultivo en ambos recipientes de inmersión temporal. No obstante los valores más altos se presentan en el recipiente de inmersión temporal de



Nalgen® (Figura 13b.), con las densidades de siembra de 1.0 y 1.5 g. Seguidamente se observan resultados relevantes para el recipiente RITA® (Figura 13a.) con los inóculos de 0.5 y 1.0 g. Para el cv. 'Dátil', el número de plántulas obtenido es bastante inferior (Figura 13c.), con excepción del tratamiento correspondiente a 0.5 g de inóculo en el recipiente Nalgen® (Figura 13d.) con el inóculo de 0.5 g, donde se contabiliza un número promedio de 26.5 plántulas.

El Cuadro 4. también muestra los datos reales del número de plántulas obtenido por recipiente. Al comparar estos valores con el número de plántulas estimado (datos obtenidos por extrapolación del número de plántulas de una muestra de 5.4 g), se puede observar que el único que mantiene un número similar al estimado fue el tratamiento de 'Curraré' en el recipiente Nalgen® con el inóculo de 0.5 g. El número de plántulas para los tratamientos restantes fue marcadamente inferior, sobre todo en el cv. 'Dátil'.

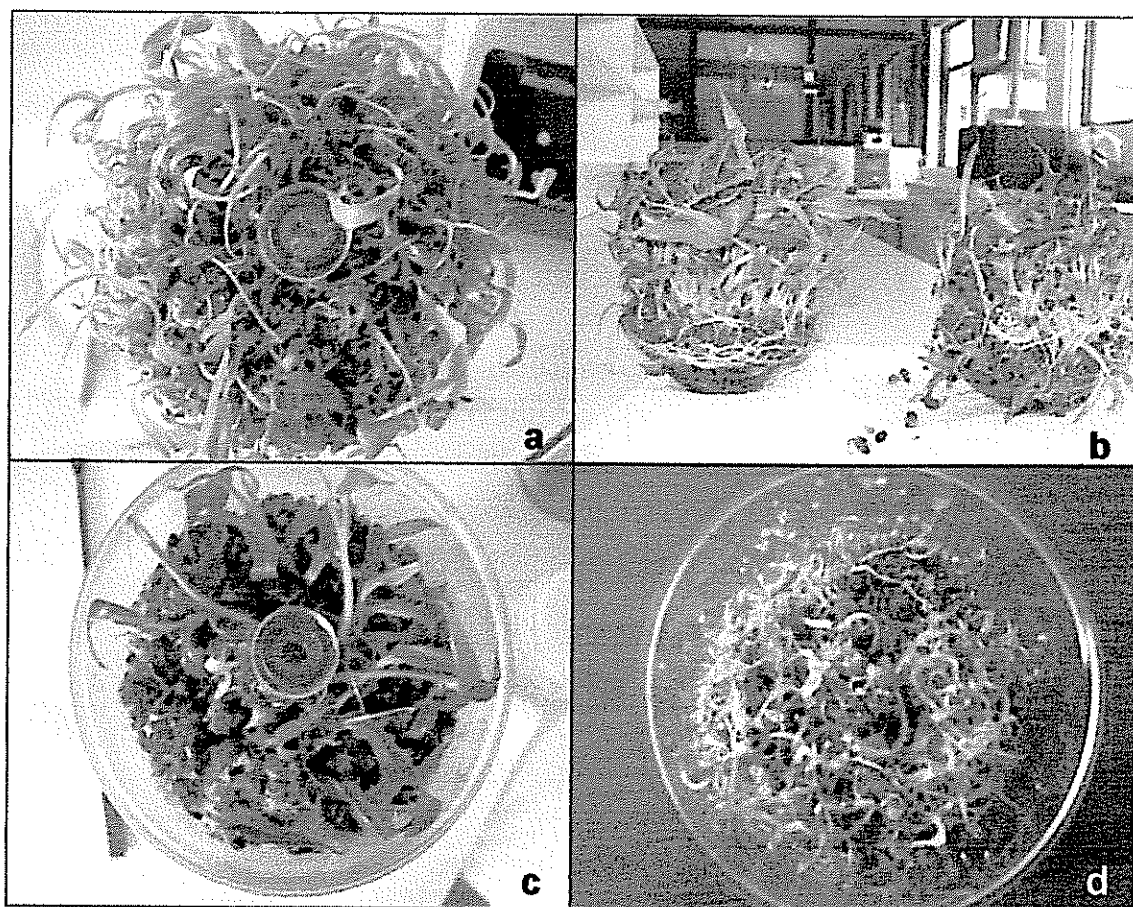


Figura 13. Plántulas de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' después de dos meses y medio de cultivo en inmersión temporal en la fase de desarrollo. a. Plántulas del cv. 'Curraré' en Nalgen®. b. Plántulas del cv. 'Curraré' en RITA®. c. Plántulas del cv. 'Dátil' Nalgen®. d. Plántulas del cv. 'Dátil' en RITA®.

Asimismo, se observa que los valores del peso fresco (PF) promedio por plántula son mayores en el cv. 'Curraré', en el recipiente Nalgen® con un inóculo de 0.5g. En este tratamiento el desarrollo óptimo de las plántulas parece estar relacionado con el número de plantas contenido en el recipiente. Este hecho es importante de tomar en cuenta para la optimización de la metodología de cultivo, la cual garantiza un desarrollo adecuado del material. Para los otros tratamientos, los valores del peso fresco (PF) por plántula, está en el ámbito de 0.03-0.11 g. En los restantes tratamientos del cv. 'Curraré' cultivados en Nalgen® se contabilizó un mayor número de plántulas pero con un peso fresco promedio inferior, lo cual se refleja en plántulas con menor longitud y desarrollo.

Estos resultados sugieren que la metodología más adecuada para un óptimo crecimiento de las plántulas en la fase de desarrollo es el recipiente Nalgen® con una densidad de cultivo inicial de 0.5, observada en el cv. 'Curraré' (Figura 13b.). Es importante recalcar que la fase de desarrollo de las plántulas se continuó en los mismos recipientes de inmersión, usados para la fase de germinación. Por lo tanto, los resultados de ambas fases indicarían cual es la mejor densidad de siembra del proceso de regeneración de embriones vía embriogénesis somática para cada cultivar evaluado.

El Cuadro 6. muestra el número de plántulas obtenido para los tratamientos testigos del cv. 'Curraré' (Figura 14a.).

Cuadro 6. Número de plántulas real obtenido y peso fresco (PF) promedio, en gramos, de una plántula para el tratamiento testigos del cv. 'Curraré', cultivado en medio semi-sólido.

Caja Petri (Tratamiento Testigo)	Nº de plántulas por Caja Petri	Promedio del PF por plántula
1	60	0.05
2	58	0.09
3	60	0.06
4	59	0.07
5	60	0.07
6	56	0.08
7	60	0.07
8	58	0.07
9	57	0.08

El número total de plántulas por caja Petri es bastante similar en todos los casos y el peso fresco (PF) promedio se mantuvo en un ámbito entre los 0.05-0.09 g, también muy parecido. Estos datos reflejan mayor constancia de los resultados en medio de cultivo semi-sólido, comparativamente con el cultivo en los recipientes de inmersión temporal; lo cual indica una mejor estabilidad de las condiciones de cultivo establecidas. Esto es

comprensible si tomamos en cuenta que el cultivo en medio semi-sólido garantiza un manejo individualizado de las plántulas.

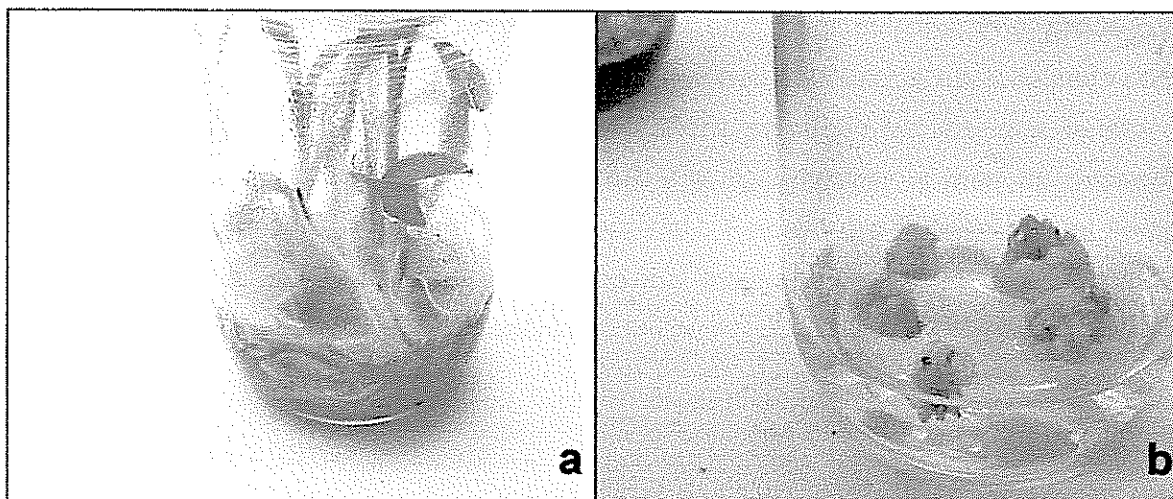


Figura 14. Cultivos del tratamiento testigo de los cv. 'Curraré' y 'Dátil' en medio semi-sólido, durante la fase de desarrollo. **a.** Plántulas del cv. 'Curraré', mostrando un crecimiento normal. **b.** Cultivo de 'Dátil', mostrando un desarrollo anormal con la regresión a la calogénesis de los embriones.

No obstante, el peso fresco (PF) promedio es menor que el obtenido para las plántulas del cv. 'Curraré' en el recipiente Nalgen® (Cuadro 5.). Esto significa que el desarrollo de las plántulas en este sistema de cultivo puede ser superior al medio de cultivo semi-sólido (Cuadro 6.), una vez que el protocolo haya sido optimizado. Para el cv. 'Dátil' no se obtuvo un número significativo de plántulas desarrolladas, lo que comprueba que el material presentó problemas; tal como se muestra en la Figura 15b.

La Figura 15. muestra los resultados del número de EG, ENG y EE del cv. 'Curraré' contados en la muestra seleccionada de los tres estratos evaluados en los recipientes de inmersión temporal estudiados.

Al igual que con el número de plántulas, también se observó diferencias estadísticamente significativas entre ambos recipientes de inmersión temporal para el número de embriones en las diferentes categorías de desarrollo (Cuadro 4., Anexo 2.). Tanto para los embriones evaluados como para las plántulas, el efecto del tamaño del recipiente influyó sobre su desarrollo; comportamiento que también fue observado en café (Etienne *et al.* 1999).

La mayor cantidad de EG se observó en el recipiente RITA© con un inóculo de 1.5 g. Este resultado concuerda con aquellos obtenidos en la fase de germinación, en los cuales se indicó que los embriones se encontraban aún en estados inmaduros y posiblemente, durante la fase de desarrollo, estos embriones culminaron el proceso de germinación. Esto indica que, quizá, estos EG provienen del material caracterizado como EE durante la fase de germinación. De igual manera, se puede suponer que, la falta de los reguladores de crecimiento como el BAP y el AIA durante la fase de desarrollo inhibieron el proceso de germinación del material. Estos datos reflejan que el tiempo aplicado para la fase de germinación debe ser mayor, para así lograr el máximo aprovechamiento del material embriogénico.

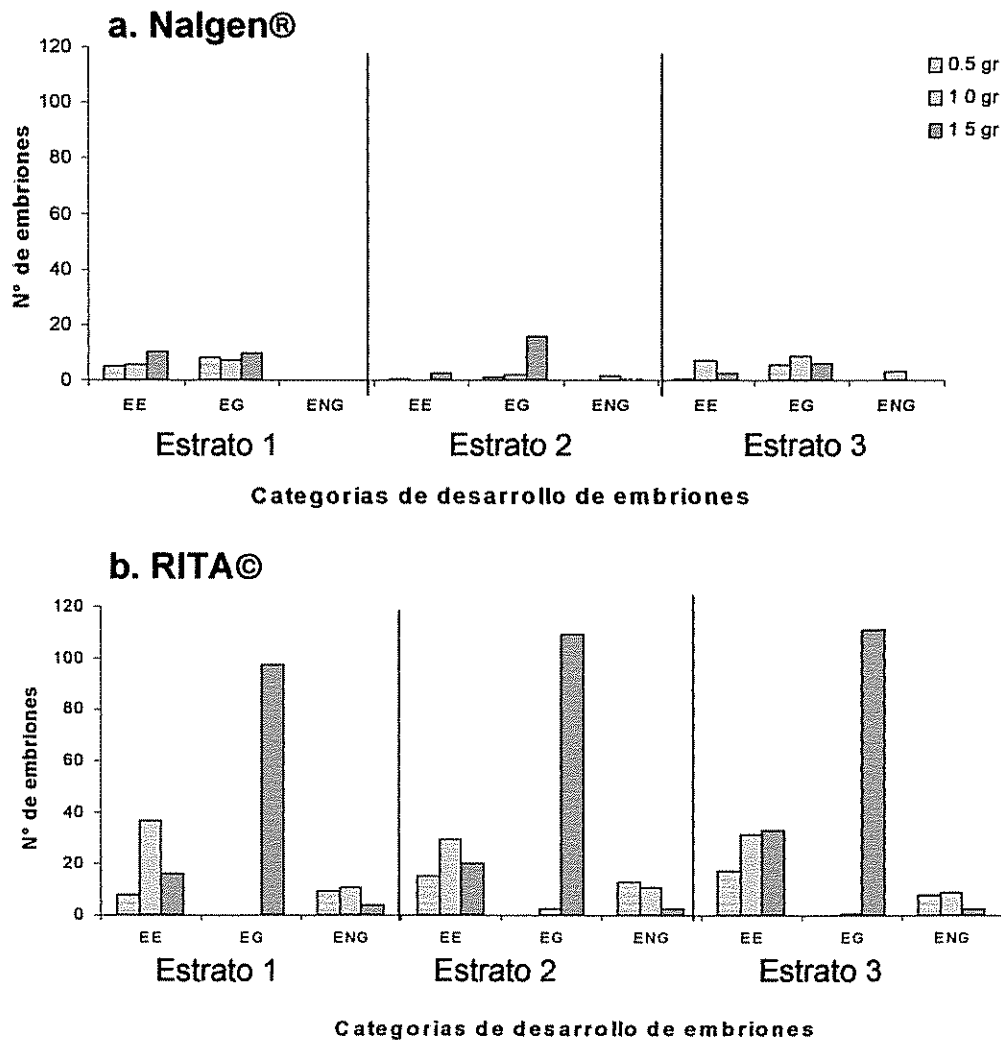


Figura 15. Número promedio de EG, ENG y EE del cv. 'Curraré' en la fase de desarrollo, cultivados en inmersión temporal, bajo tres densidades de siembra (0.5, 1.0 y 1.5 g). a. Número de embriones en el recipiente Nalgen®. b. Número de embriones en el recipientes RITA©.

El efecto de la densidad de inóculo es estadísticamente significativo durante la fase de desarrollo para todas las categorías de desarrollo de embriones, así como para el número de plántulas obtenidas (Cuadro 4., Anexo 2.). Con esto se muestra que el número promedio de ENG y EE es significativamente mayor en el inóculo de 1.5 g. Con respecto al número de plántulas se indican diferencias significativas entre los inóculo de 1.0 y 1.5 g, pero no con la densidad inicial de 0.5 g. (Cuadro 7.). Estos resultados confirman observaciones anteriores que sostienen que a menor densidad de siembra, mejor es el desarrollo de los embriones y de las plántulas obtenidas, ya que hay una menor competencia. Relaciones que también fueron observadas por Etienne *et al.* (1999) en café.

Cuadro 7. Significancias del número de embriones germinados (EG), embriones no germinados (ENG), embriones emergidos (EE) y plántulas del cv. 'Curraré', presentes en los tres estratos para cada recipiente y los inóculos usados (0.5, 1.0 y 1.5 g) en la fase de desarrollo. Se usó la prueba de Duncan con un  $\alpha$  de 0.01. No se usó el testigo.

Estrato	1		2		3	
	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia
EG	5.2135	a	8.0625	a	6.375	a
ENG	3.875	b	7.313	a	7.458	a
EE	1.8958	a	1.8021	a	1.5833	a
Plántulas	3.875	a	3.6042	ab	3.0417	b
Inóculo (g)	0.5		1.0		1.5	
	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia
EG	3.389	a	7.911	a	5.384	a
ENG	0.022	b	0.422	b	16.204	a
EE	0.533	b	0.978	b	3.435	a
Plántulas	3.0889	ab	4.7333	a	2.833	b

La posición del material germinativo en el recipiente, también incide directamente en el proceso de conversión de embriones en plantas y el desarrollo de las mismas. Estas diferencias se observan en el número de plántulas obtenidas en el estrato superior (estrato 1) del recipiente con relación al estrato inferior (estrato 3) y con valores intermedios para el segundo estrato (Cuadro 7.). Asimismo se observa que en los estratos inferiores predomina el mayor número de ENG.

Esto refleja un proceso de estratificación del material en el recipiente, lo cual influye en el desarrollo de los embriones, la conversión a plántulas y el desarrollo de las mismas. Posiblemente, este comportamiento obedece a que en los estratos inferiores, la competencia por luz y espacio es más intensa. Debido a esto, los embriones tienen menos probabilidades de desarrollarse en plantas, comparativamente con los embriones

de la parte superior del recipiente, donde hay una exposición más directa a la luz y al intercambio gaseoso; favoreciendo el desarrollo de las plántulas.

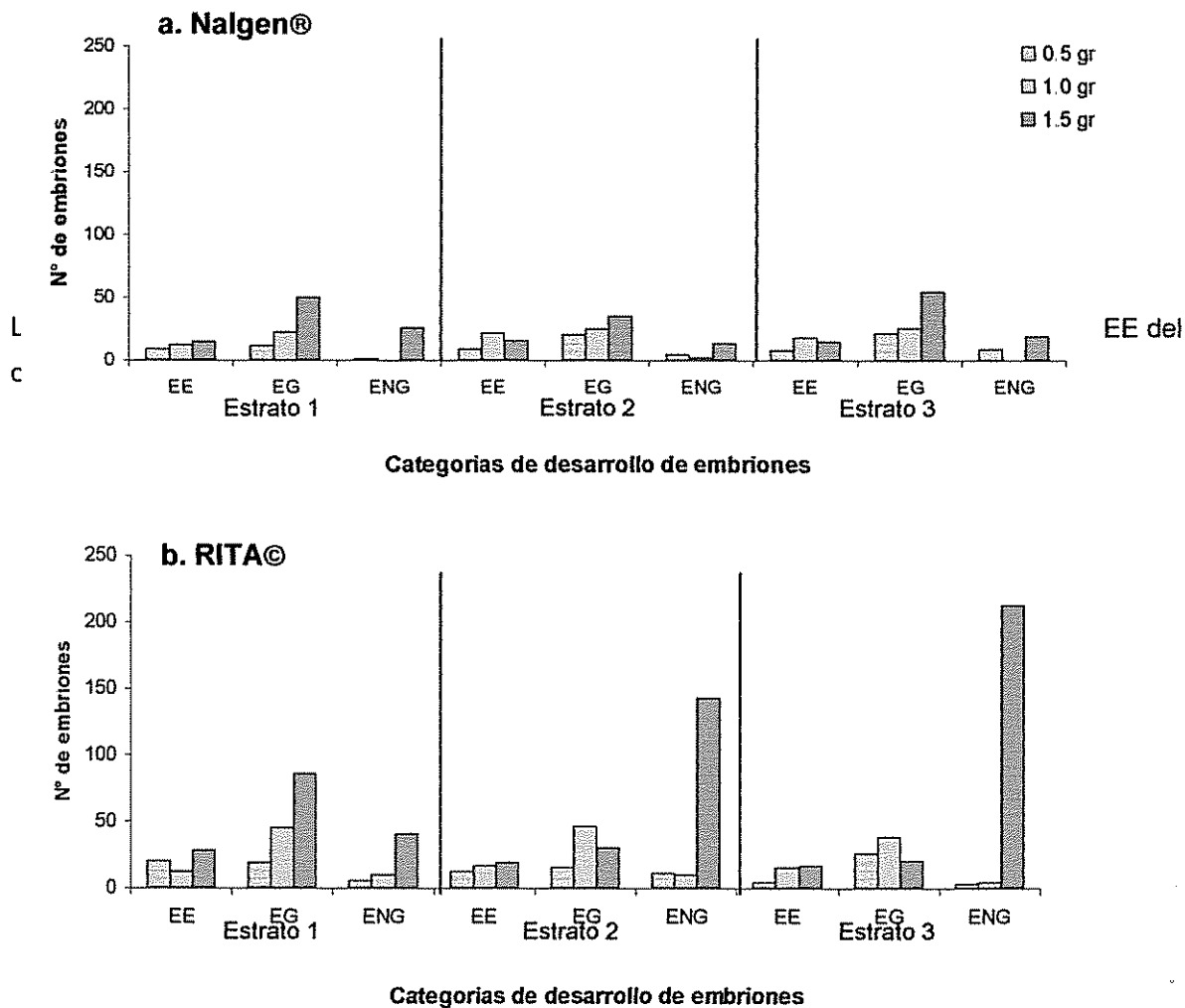


Figura 16. Número promedio de EG, ENG y EE del cv. 'Curraré' en la fase de desarrollo, cultivados en inmersión temporal, bajo tres densidades de siembra (0.5, 1.0 y 1.5g). **a.** Número de embriones en el recipiente Nalgen®. **b.** Número de embriones en el recipientes RITA©.

El patrón de comportamiento de este cultivar indica que el material embriogénico con el que se inició la fase de desarrollo se caracterizó por un alto grado de inmadurez y una baja sincronización. Estas características influyen en la respuesta del material durante toda la fase de desarrollo.

No obstante, en este cultivar también se observan diferencias significativas durante el proceso de conversión de embriones en plántulas y en el desarrollo de las mismas, en

función del recipiente de cultivo utilizado y del inóculo inicial de cultivo (Cuadro 5., Anexo 2.). Una mejor respuesta al cultivo en Nalgen® se traduce en el mayor número de plántulas obtenido en este recipiente, en relación con los resultados observados en el recipiente RITA®, en el cual predominan los EG y los ENG en la fase de desarrollo. Esta respuesta posiblemente refleja que en el Nalgen® se presentaron mejores condiciones de cultivo, que facilitaron el proceso de germinación y eventualmente el desarrollo de las plántulas. En este cultivar también se observa un alto grado de significancia estadística en cuanto a las densidades de cultivo (0.5, 1.0 y 1.5 g), lo cual indica que a densidades de siembra inferiores se obtiene una mejor respuesta en el crecimiento y desarrollo de plántulas (Cuadro 8.). Como consecuencia al utilizar el inóculo de 1.5 g el patrón de desarrollo se orienta hacia estadios más tempranos del desarrollo embriogénico.

Cuadro 8. Significancias del número de embriones germinados (EG), embriones no germinados (ENG), embriones emergidos (EE) y plántulas del cv. 'Dátil', presentes en los tres estratos y los inóculos usados (0.5, 1.0 y 1.5 g) en la fase de desarrollo. Se usó la prueba de Duncan con un  $\alpha$  de 0.01. No se usó el testigo.

Estrato	1		2		3	
	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia
EG	12.467	a	9.733	b	10.533	ab
ENG	4.0333	c	7.2833	b	9.7167	a
EE	4.4833	a	4.45	a	4.3833	a
Plántulas	0.9833	b	0.7833	ab	1.1667	a

Inóculo (g)	0.5		1.0		1.5	
	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia	Promedio	Significancia
EG	5.667	c	11.5278	b	15.33	a
ENG	2.1852	b	1.5278	b	19.1481	a
EE	3.3704	b	4.5833	ab	5.3148	a
Plántulas	2.4074	a	0.583	a	0.0741	b

Al igual que en el cv. 'Curraré', en el cv. 'Dátil' se observó una estratificación en el proceso de desarrollo; es decir, que la conversión en plantas y el desarrollo de las mismas fue mayor en los estratos superiores del recipiente de cultivo (Cuadro 8.). Asimismo, los fenómenos de etiolación e hiperhidricidad son más acentuados en los estratos inferiores del recipiente. Estas observaciones concuerdan con la afirmación de Etienne *et al.* (1999) acerca de la inmadurez y asincronía observada en los estratos inferiores del recipiente RITA®. Esto posiblemente, se debe a la alta competencia por recursos (Novak *et al.* 1989) y a la influencia del embrión vecino que disminuye la capacidad de responder a las señales de desarrollo (Finstad *et al.* 1993).

La evaluación de la calidad de las plántulas obtenidas en la fase de desarrollo, se realizó con base en una submuestra de 20 ó 30 individuos, a los cuales se les evaluó el número de hojas, la longitud (cm), el peso fresco (PF) y el peso seco (PS), en gramos y el porcentaje de contenido de agua (%CA), como variables cuantitativas (Figura 17). De igual manera se evaluó algunas variables cualitativas como presencia de raíces, hiperhidricidad, daños y malformaciones.

La Figura 17a. muestra el número de hojas promedio para cada tratamiento en ambos cultivares. Los valores oscilan de 4 a 10 hojas, indicando que hay diferencias estadísticamente significativas entre las variables de estudio (Cuadro 6., Anexo 2.)

Se observa la tendencia general de que el número de hojas por plántula aumenta conforme es mayor la densidad de cultivo, fenómeno más marcado en el cv. 'Dátil'. Esto posiblemente, sea una respuesta al estrés generado por la competencia de espacio, luz y nutrientes en la cual se desarrollan las plantas en alta densidad de cultivo. Aunque el número de hojas es un indicativo de la edad de la planta, para algunos casos, puede darse una aceleración en el desarrollo como estrategia de sobrevivencia, debido a las condiciones de luz en el ambiente en que crecen (Taiz y Zeiger 1998).

Estos resultados pueden relacionarse con el aumento del número de plántulas que presentaban un crecimiento en roseta para algunos tratamientos, sobretudo para el cv. 'Dátil' y mayormente acentuada en el recipiente RITA®. En consecuencia, las plántulas de este recipiente desarrollaron más hojas, posiblemente por un asunto de densidad de cultivo. Con esto se confirma lo que Etienne *et al.* (1999) observó en su trabajo sobre café, que una alta densidad de inóculo influye sobre el crecimiento y desarrollo del material.

En el cv. 'Curraré', el mayor número de hojas también se observa en el recipiente RITA®, a una densidad de inóculo de 1.5 g. Comparativamente, el recipiente Nalgen® con un inóculo de 0.5 g, presenta el número promedio menor de hojas. Posiblemente, está relacionado con un mayor crecimiento en longitud y buen desarrollo de las plantas.



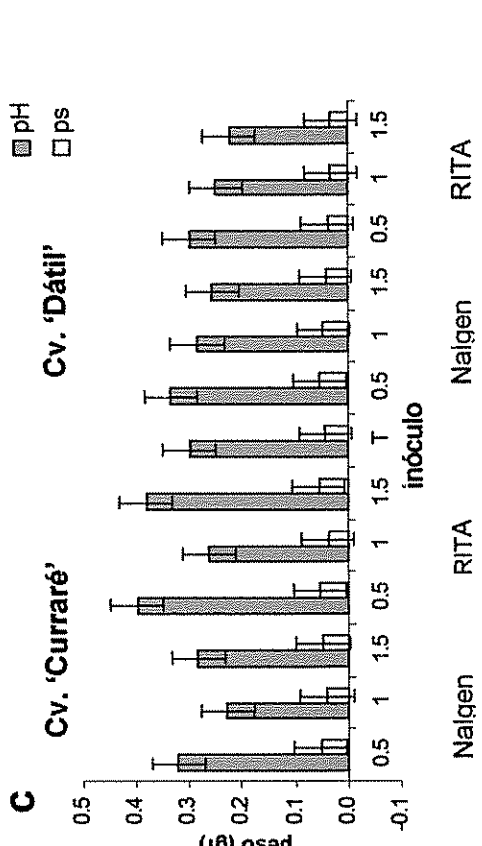
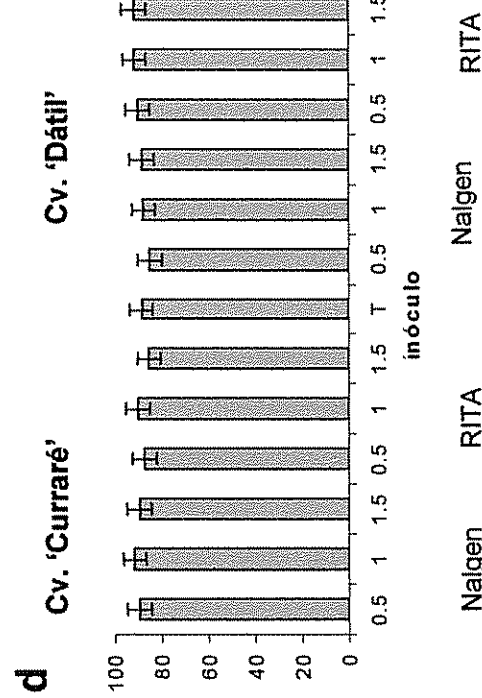
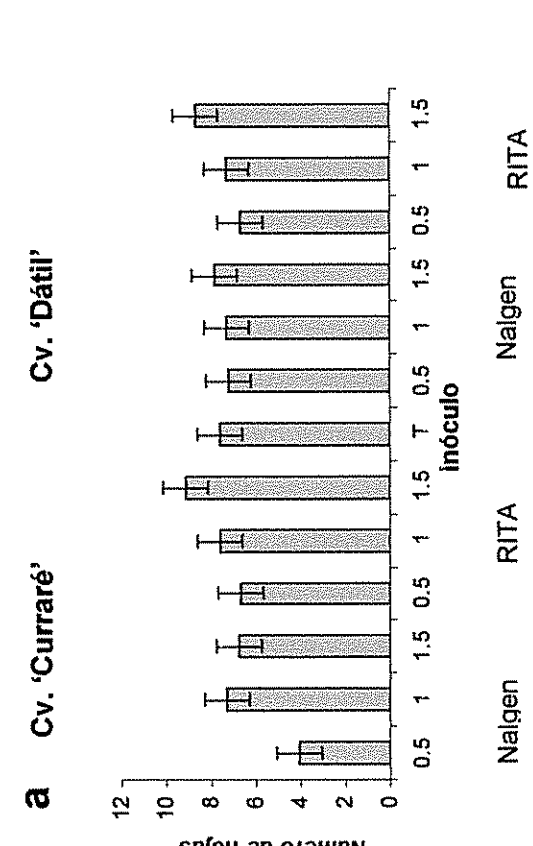
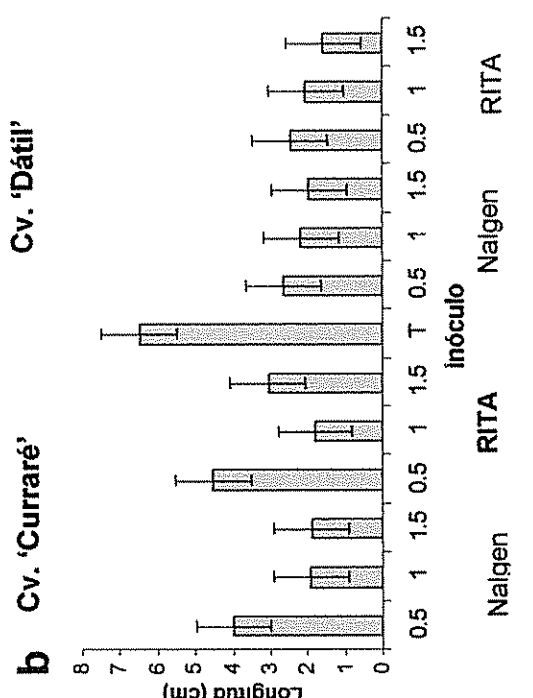


Figura 17. Número de hojas (a), longitud, en centímetro, (b) peso fresco (PF) y peso seco (PS), en gramos (c) y porcentaje de contenido de agua (d), para las plántulas evaluadas durante la fase de desarrollo de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil', según los inoculos (0.5, 1.0 y 1.5 g) y los recipientes de inmersión usado (RITA® y Nalgen® de Nalgen), empleando un  $\alpha < 0.05$ . No se tomo en cuenta el testigo.

El comportamiento observado en las plántulas del tratamiento testigo (T) no difiere de los resultados mostrados para los tratamientos de inmersión temporal (Figura 17a.). Hay que hacer notar que estas plántulas tuvieron una germinación cercana al 98% y que muchas de ellas ya habían crecido cuando fueron transferidas a la fase de desarrollo.

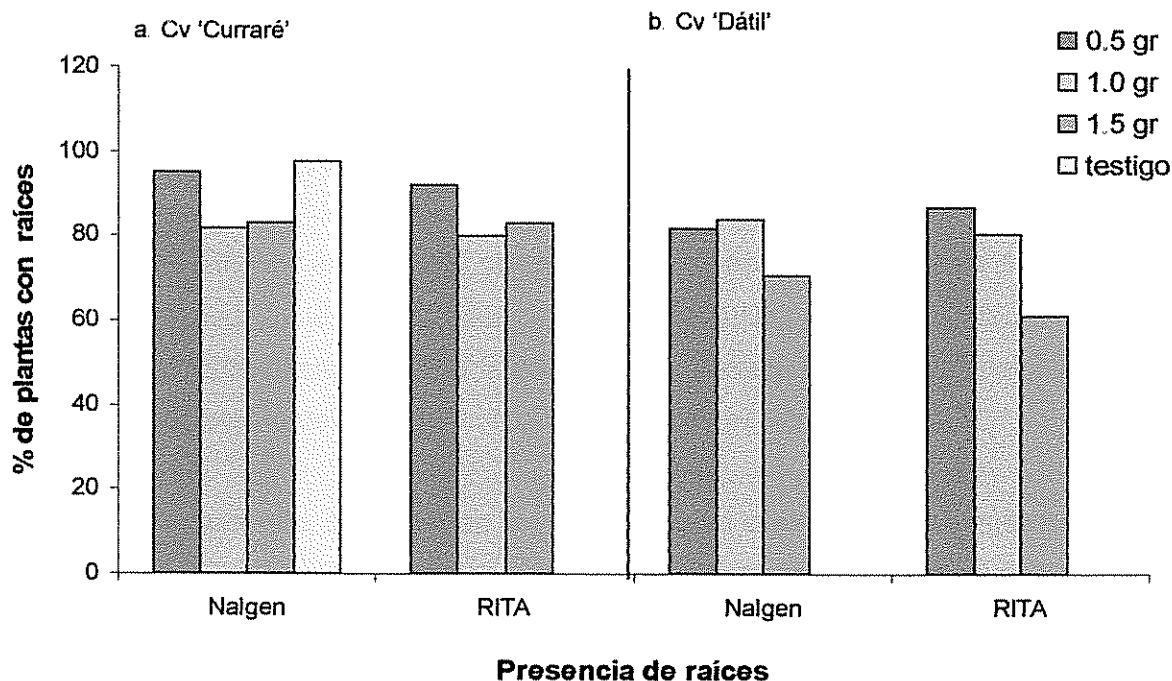


Figura 18. Porcentaje de plántulas con raíces presentes en los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' para los recipientes de inmersión temporal usado (RITA® y Nalgen®) con los inóculos de siembra (0.5, 1.0 y 1.5 g.) y el testigo en medio semi-sólido.

El porcentaje del número de plantas con raíces fue alto y se encuentra entre el 97.2 y el 60% (Figura 18.). El porcentaje más alto lo presenta el testigo con un porcentaje del 97.5%, lo cual es esperado si tomamos en cuenta que este protocolo fue establecido con alto grado de eficiencia. Mientras que para los recipientes de inmersión temporal el ámbito de formación de raíces es de 95 a 60%, sin mostrar diferencias significativas (Cuadro 7., Anexo 2.), lo cual sugiere la presencia de condiciones microambientales muy similares en ambos recipientes. Sin embargo, los mayores porcentajes se muestran en el recipiente Nalgen® con el inóculo de 0.5 g. Para el cv. 'Curraré' y el más bajo fue para el cv. 'Dátil' en el recipiente RITA® con un inóculo de 1.5 g.

Esto significa que también existe un efecto estadístico de la densidad de cultivo sobre la respuesta de las plantas al desarrollo de raíces. Sin embargo, podría sugerirse una mayor afinidad entre el inóculo de 0.5 y 1.0 g. Con esto se muestra lo que ya se ha

mencionado, un inóculo adecuado permite que las plántulas se desarrollen satisfactoriamente (Etienne *et al.* 1999), ya que no existe una fuerte competencia por el recurso (Zamarripa *et al.* 1987).

De la misma manera que se observó mayor eficiencia del cv. 'Curraré' en el desarrollo de la parte aérea, también se demuestra mayor capacidad de desarrollo de las raíces. Posiblemente esto esté relacionado con los problemas de sincronización observados en el cv. 'Dátil', que ya han sido mencionados.

En café, Etienne *et al.* (1999) observaron que el desarrollo de raíces durante el cultivo en RITA© favorece las condiciones de las vitroplántulas para su aclimatación. Para *Musa*, la presencia de raíces, previa a la aclimatación, pareciera no ser indispensable debido a su gran capacidad de adaptación a las condiciones *ex vitro*.

En la Figura 17b. se muestran los resultados del crecimiento en longitud de las plántulas en los diferentes tratamientos evaluados. Se puede observar que las plántulas que presentan mayor tamaño son las del testigo del cv. 'Curraré', muy posiblemente debido a las condiciones de crecimiento más individualizadas al cual las plantas están expuestas. Bajo estas condiciones la competencia por luz y espacio, tanto horizontal como verticalmente, es menor. Asimismo, aquellas plántulas que se desarrollaron en el sistema de inmersión temporal, se presentaron un mayor tamaño en los tratamientos del cv. 'Curraré' con los inóculos de 0.5 g, para ambos recipientes de inmersión temporal. Estos resultados corresponden a lo esperado según el comportamiento de estos cultivares a lo largo de todas las fases de la embriogénesis somática.

Como era de esperar, las variables de PF y PS muestran diferencias estadísticamente significativas principalmente al nivel del inóculo, siendo 0.5 g el que posee plántulas con un promedio mayor (Figura 17c.). La correlación de ambas variables es de 0.846, indicando que ambas explican casi de igual manera el 85% de los resultados.

Este mayor peso fresco puede estar relacionado con el número de hojas, o bien con la longitud de las plántulas. Para la mayoría de los tratamientos de ambos cultivares y con un inóculo de 0.5 g, el número promedio de hojas por plántula oscila entre 6 y 8; mientras que para el cv. 'Curraré' en el recipiente Nalgen® y con un inóculo de 0.5g, poseen un promedio de cuatro hojas por plántula. No obstante, el incremento en peso de este cultivar y bajo estas condiciones específicas de cultivo se debe a la mayor longitud

que mostraron las plántulas de este tratamiento. Asimismo, las plántulas de este cultivar en el recipiente RITA®, con el mismo inóculo de 0.5 g, muestran un valor de peso fresco (PF), también significativo, porque posee plántulas de gran tamaño y con abundantes hojas.

Estas observaciones indican que ambos recipientes proveen las condiciones adecuadas para que se dé un buen desarrollo de las plántulas. Sin embargo podría decirse que durante la fase de germinación las condiciones generadas por el recipiente Nalgen®, fueron propicias para generar un mayor número de plántulas de cultivo con óptimo desarrollo.

La variable del contenido de agua (%CA), en este caso no hace ningún aporte para discriminar entre tratamientos, ya que no se encuentran diferencias significativas (Figura 17d.).

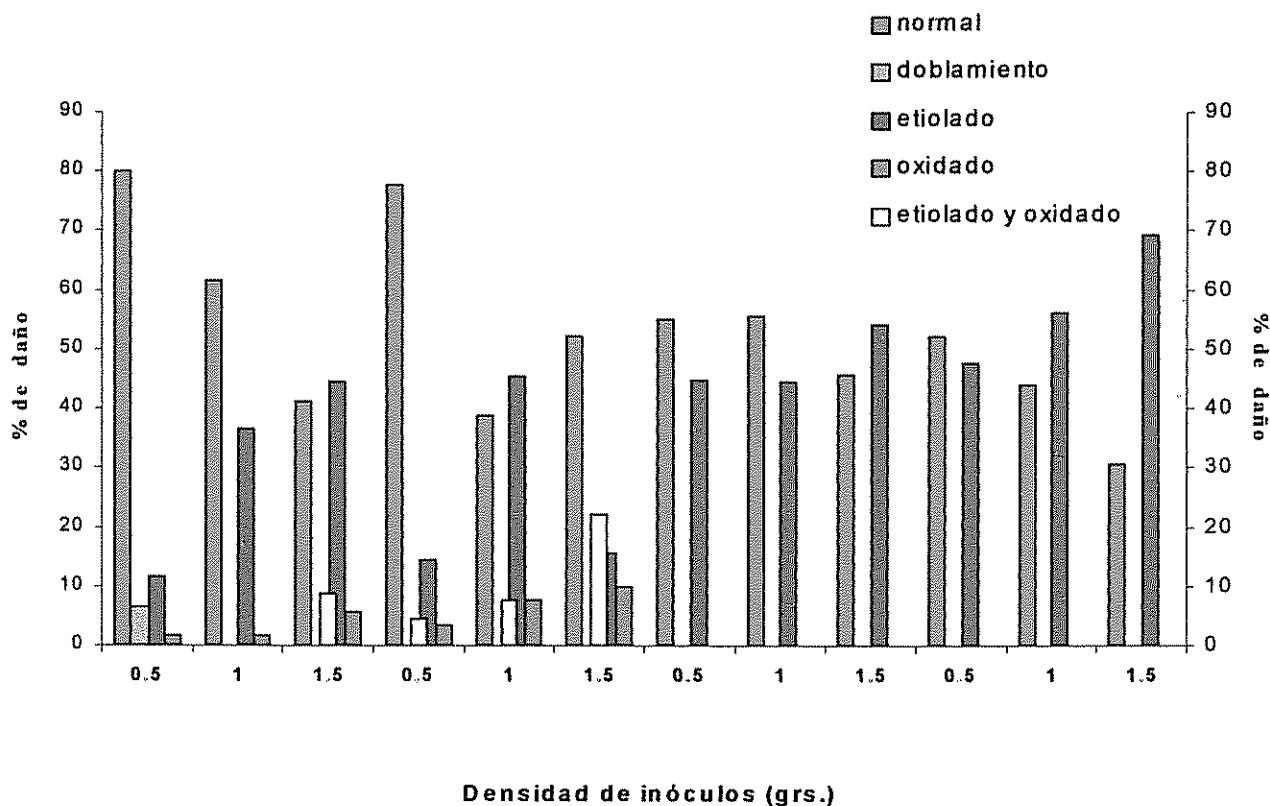


Figura 19. Porcentaje de daños observados en las plántulas de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' durante la fase de desarrollo, en inmersión temporal (RITA® y Nalgen®) bajo tres densidades de inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 g). Se empleó un  $\alpha < 0.05$ . No se tomó en cuenta el testigo.

Tal como se ha observado durante el análisis de los resultados en la fase de desarrollo, la variable de densidad de cultivo ha sido decisiva sobre los resultados. En este sentido, Etienne *et al.* 1999, señalan a cerca de su trabajo en café, que una alta densidad de inóculo va a incidir directamente sobre la longitud, el peso fresco y el desarrollo de las plántulas en el sistema de inmersión temporal.

La mayoría de los daños y malformaciones observadas durante la fase de desarrollo presentaron baja frecuencia, por lo que sólo se incluyeron para el análisis estadístico la etiolación, la oxidación y algunos daños mecánicos (Figura 19.).

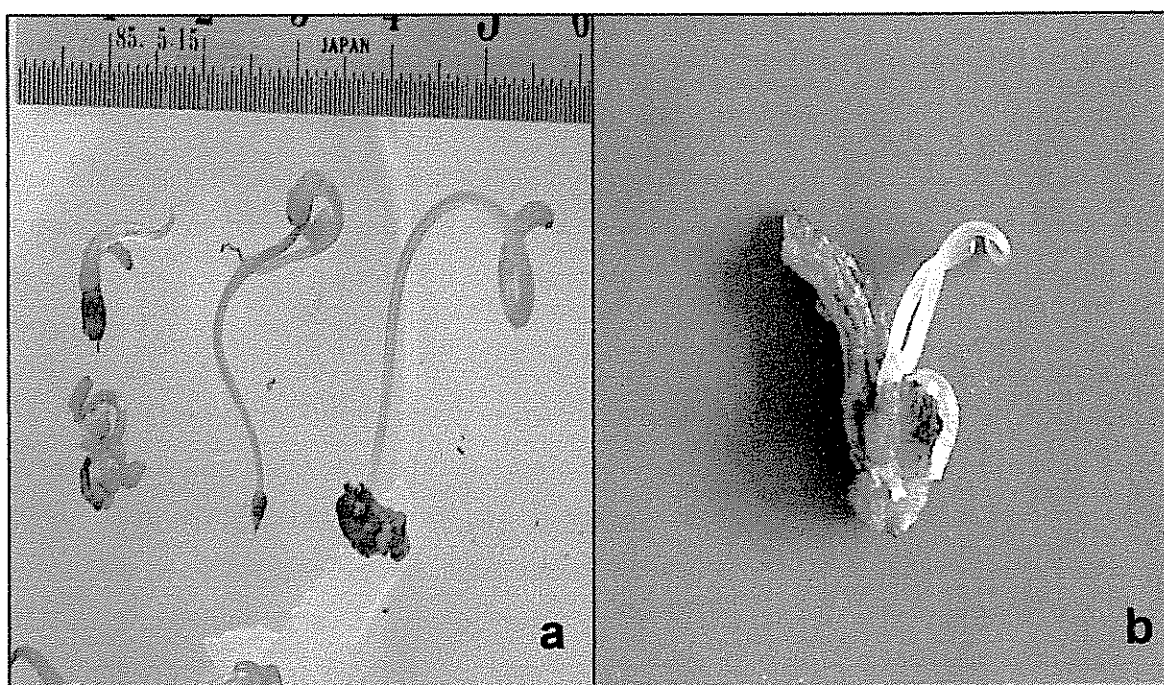


Figura 20. Plántulas del cv. 'Curraré', mostrando a. El fenómeno de etiolación. b. El fenómeno combinado de etiolación y oxidación.

Se observa que los tratamientos presentan diferencias entre el tipo y la cantidad de daños presentes en las plántulas en cada recipiente. El daño más común fue la etiolación, seguido de la combinación de material etiolado y oxidado. Es importante destacar que mientras la mayoría de los tratamientos del cv. 'Curraré' sufrió de oxidación y etiolación (Figura 20a.), el cv. 'Dátil' sólo presentó etiolación (Figura 20b.), producto de la competencia por luz que se mantenía en los recipientes. Se puede observar que la etiolación es mínima en las plantas provenientes del inóculo de 0.5 g y aumenta en inóculos mayores (1.0 y 1.5 g). Además las plántulas del cv. 'Curraré' en el tratamiento de 1.5 g del recipiente Nalgen® presentaron oxidación, al igual que las plántulas del

recipiente RITA® en los tres inóculos. Sin embargo el tratamiento de del mismo cultivar en el recipiente de Nalgen® con un inóculo de 0.5 g, fue el único que presentó daños mecánicos.

La disponibilidad de luz es fundamental para el desarrollo normal de las plántulas, como consecuencia la etiolación es la respuesta fisiológica y anatómica de las plántulas a la poca disponibilidad de luz (Taiz y Zeiger 1998). Estos resultados muestran el efecto negativo de altas densidades de cultivo sobre el desarrollo de las plantas, donde se da mayor competencia por espacio, luz y nutrientes (Etienne *et al.* 1999; Novak *et al.* 1989).

La oxidación del material es un problema que se presenta frecuentemente en algunos cultivos en respuesta a condiciones de estrés. Bieberach (1995) observó este fenómeno en embriones somáticos del cv. 'Dominico', usando el recipiente Nalgen®. La oxidación se observa con mayor frecuencia en aquellos cultivares que se caracterizan por producir altos contenidos de fenoles de manera natural. Estos resultados indican que, posiblemente, el cv. 'Curraré' se caracteriza por una mayor síntesis de fenoles en comparación con el cv. 'Dátil'

Los daños mecánicos como doblamiento y ruptura de hojas, quiebre del tallo de la plántula o pérdida de la raíz, sólo fueron observados en las plántulas del cv. 'Curraré', cultivados en el recipiente Nalgen® con un inóculo de 0.5 g (Figura 19.); sin embargo hay que aclarar que la cantidad de plántulas dañadas fue mínima y ninguna presentaba lesiones graves que ameritara desecharlas. Este hecho puede estar relacionado con la falta de espacio del que disponen las plántulas para crecer en cada tipo de recipiente, es decir a la dificultad de individualizarse. Asimismo, se debe recordar que en este tratamiento se obtuvieron las plántulas de mayor tamaño y desarrollo, por lo que el espacio ofrecido por el recipiente pudo incidir en este tipo de daño.

En relación con las malformaciones se encontró una muy faja frecuencia en las plántulas de ambos cultivares, por esto no se aplicó un análisis estadístico; sino que se realizó una breve descripción de las mismas.

También se observó que algunas plántulas presentaron estructuras semejantes a hojas filamentosas, otras desarrollaron raíces con estructuras que podrían ser cloroplastos (Figura 21c.); lo cual posiblemente sea efecto de la misma etiolación de las plántulas. Además se observó que en algunas plántulas brotaban raíces de los pseudotallos (Figura 21d.) y otras presentaban fusión en la radícula (Figura 21f.). De acuerdo a Soto (1995),

las plantas del género *Musa* poseen un sistema radical fibroso con capacidad adaptativa a condiciones ambientales en medios anegados, por lo que es típico la regeneración de raíces durante la aclimatación.

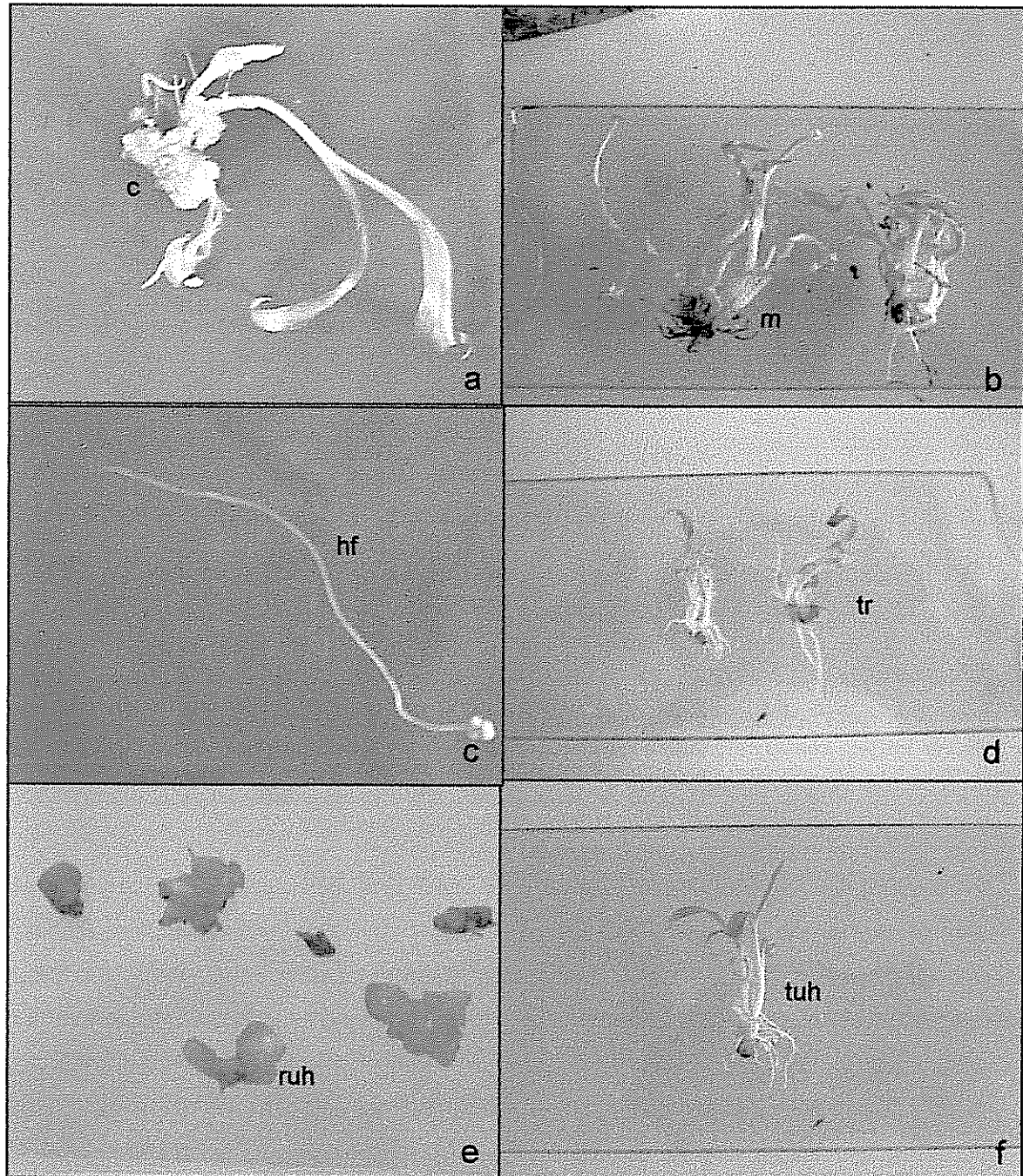


Figura 21. Diferentes malformaciones encontradas de manera ocasional en los dos recipientes de inmersión temporal (RITA© y Nalgen©), para los cvs. 'Curraré' y 'Dátil'. a. Plántula con callo. (c), b. Plántulas en macolla (m). c. Hojas filamentosas (hf). d. plántulas con raíces creciendo en pseudotallo (tr). e. Plántulas con malformaciones en las cuales se muestran conexiones de los haces vasculares entre plántulas con unión de radícula (ruh). f. Unión de pseudotallos (tuh).

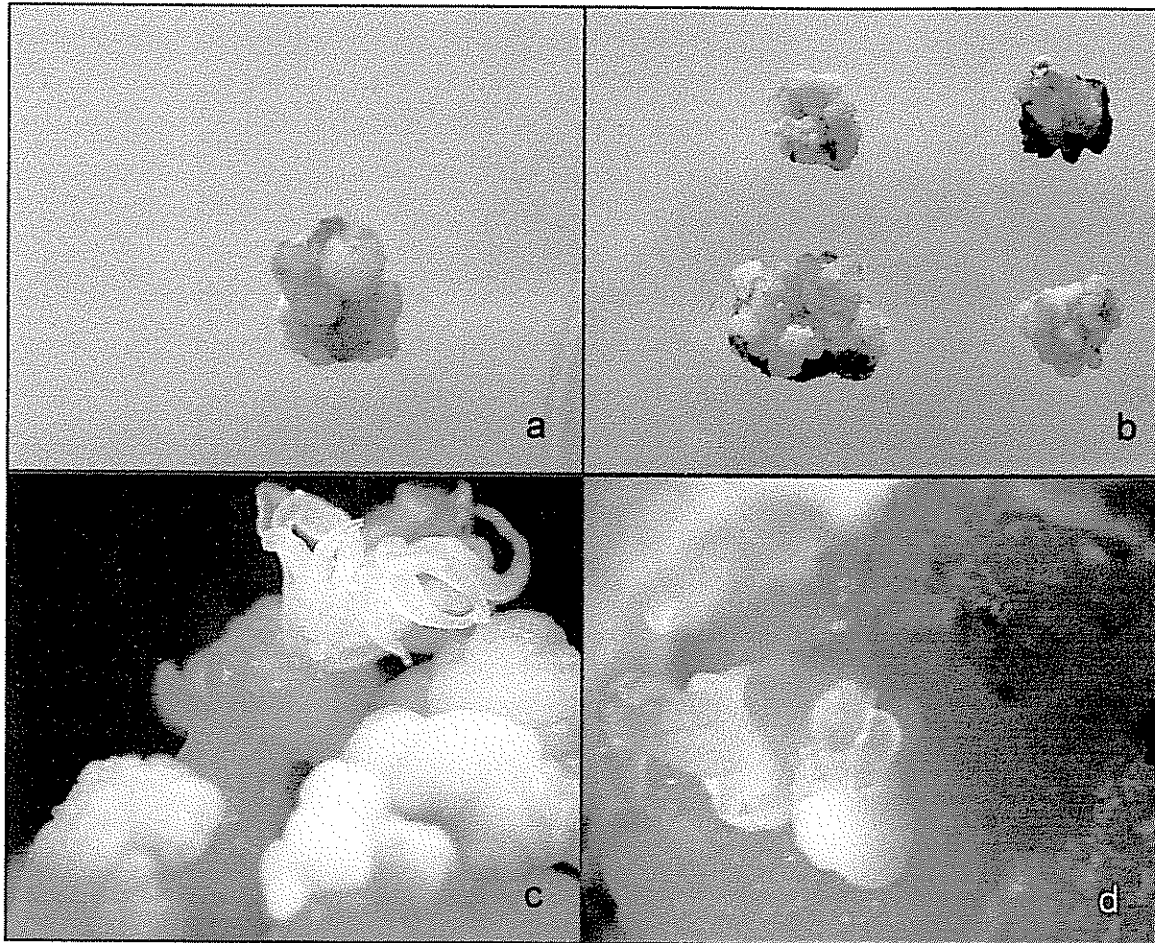


Figura 22. Estructura de los callos formados en el tratamiento testigo del cv. 'Dátil', durante la fase de desarrollo. **a.** Formación de estructuras diferenciadas, las cuales parten de los agregados pero no forman ni meristemas, ni plántulas. **b.** Callos con regiones fotosintéticas. **c.** y **d.** Estructuras semejantes a hojas, las cuales no se desarrollan.

Para el tratamiento testigo del cv. 'Dátil' se observó problemas en el proceso de micropropagación, posiblemente debido al desajuste en los periodos de tiempo de cada fase, principalmente durante la fase de regeneración de las SCE. Como efecto de eso, los embriones que se sembraron para la fase de desarrollo en el medio Ma<sub>5</sub>, con 7 g de Phytigel, formaron estructuras semejantes a callos (Figura 22a., 22b. 22c. y 22d.). Este fenómeno se presentó en todos los tratamientos, ni un solo embrión se transformó en plántula. En la Figura 23. se muestra un corte histológico de uno de los callos, el cual está compuesto por tejido parenquimatoso con células llenas de estructuras que contienen almidón. Se supone que este efecto se relaciona a una diferenciación de las células meristemáticas. La causa que generó esta respuesta en los callos aún no se ha determinado.



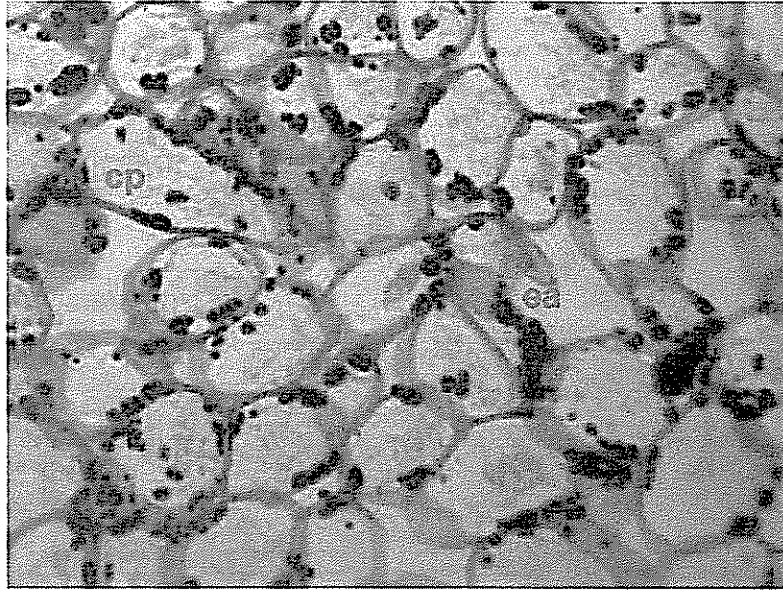


Figura 23 Corte transversal de un callo del cv. 'Dátil', generado durante la fase de desarrollo (25x). Se observan células parenquimatosas (cp) conteniendo estructuras que asemejan cúmulos de almidón (ea)

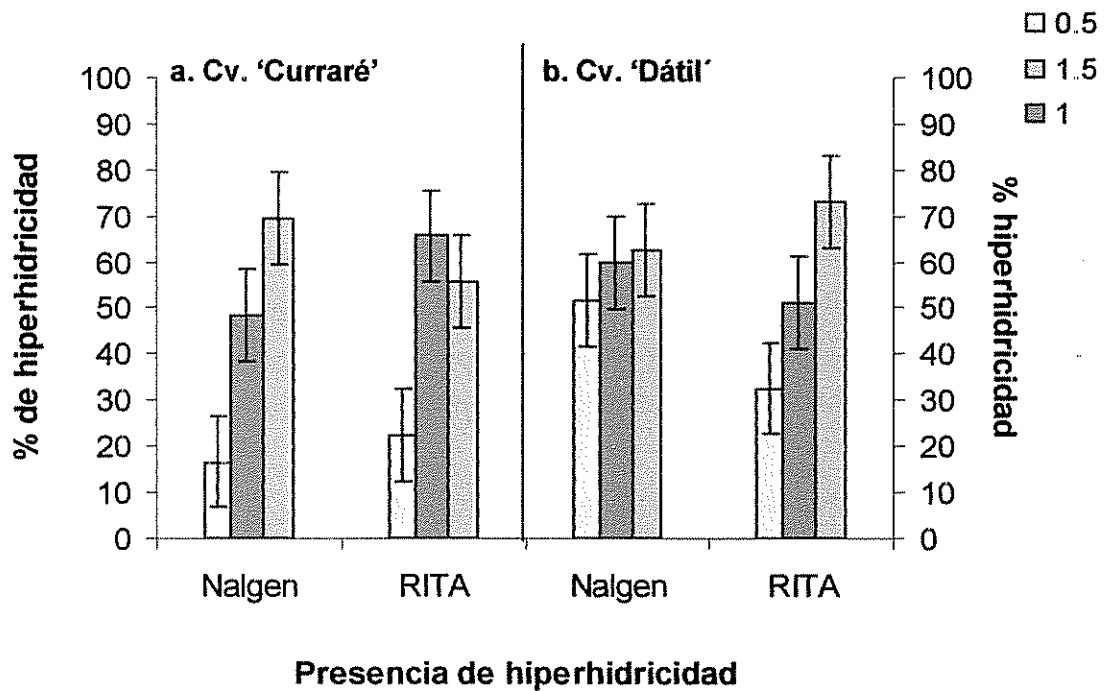


Figura 24. Porcentajes promedio de la hiperhidricidad observada en las plántulas de los cvs. de 'Curraré' y 'Dátil' cultivadas en los recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA®) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido con tres inóculos (0.5, 1.0 y 1.5 g) durante la fase de desarrollo.

En la Figura 24. se muestran el porcentaje promedio de hiperhidricidad para los tratamientos evaluados. Las plántulas del tratamiento testigo del cv. 'Curraré' no presentaron hiperhidricidad; mientras que para los tratamientos que usaron la inmersión temporal si se señala algún nivel de hiperhidricidad.

Se observó que ambos cultivares presentaron un nivel similar de hiperhidricidad. Mayor *et al.* (2003) en su trabajo sobre hiperhidricidad en girasol, concluyó que existe una fuerte influencia del componente genético en la respuesta a este fenómeno. Sin embargo, en los cultivares de *Musa* no se ha observado tal efecto, más bien las diferencias estadísticas entre cultivares es mínima, según los resultados obtenidos en este trabajo.

La hiperhidricidad es un fenómeno muy común en la industria de micropropagación y es la causa de la pérdida de un 60% del material de producción; además es más frecuente en especies de monocotiledóneas (Pâques y Boxus 1987). Se considera que es causada por una difusión pasiva del agua dentro del tejido; o bien, por un fuerte efecto de disturbios metabólicos del material (Pâques 1991). Sin embargo, no se puede definir una única razón que genere este desorden (Pâques y Boxus 1987). Como primer efecto visual el material se vuelve vítrico y altamente quebradizo (Mayor *et al.* 2003), en el nivel anatómico y fisiológico los cambios producen malformaciones en el vástago (Pâques y Boxus 1987). La implementación del uso del cultivo en medios líquidos en inmersión continua, permitió eliminar el efecto reductor del potencial hídrico del medio que tienen los gelificantes y que incide en la manifestación de hiperhidricidad. No obstante, se ha observado un incremento en la tasa de este fenómeno en el material, debido a la humedad relativa contenida en el recipiente (Pâques y Boxus 1987). En la Figura 25. se muestran plantas sanas e hiperhídricas para los dos cultivares evaluados.

El efecto del tipo de recipiente de inmersión temporal usado (Nalgen® y RITA©), sobre el grado de hiperhidricidad de las plántulas no señaló diferencias estadísticamente significativas. Esto indica que las condiciones microambientales de ambos recipientes, podrían ser muy similares. No obstante, se indican diferencias estadísticamente significativas en aquellos tratamientos con mayor densidad de siembra (inóculos 1.0 y 1.5 g); en los cuales se presenta mayor cantidad de plántulas hiperhídricas, que para los tratamientos con el inóculo inicial de 0.5 g. Sin embargo, este hecho puede estar relacionado con la cantidad de humedad relativa, casi cercana a 100%, que guardan los recipientes (Pâques y Boxus 1987) y la relación con la biomasa presente en ellos.

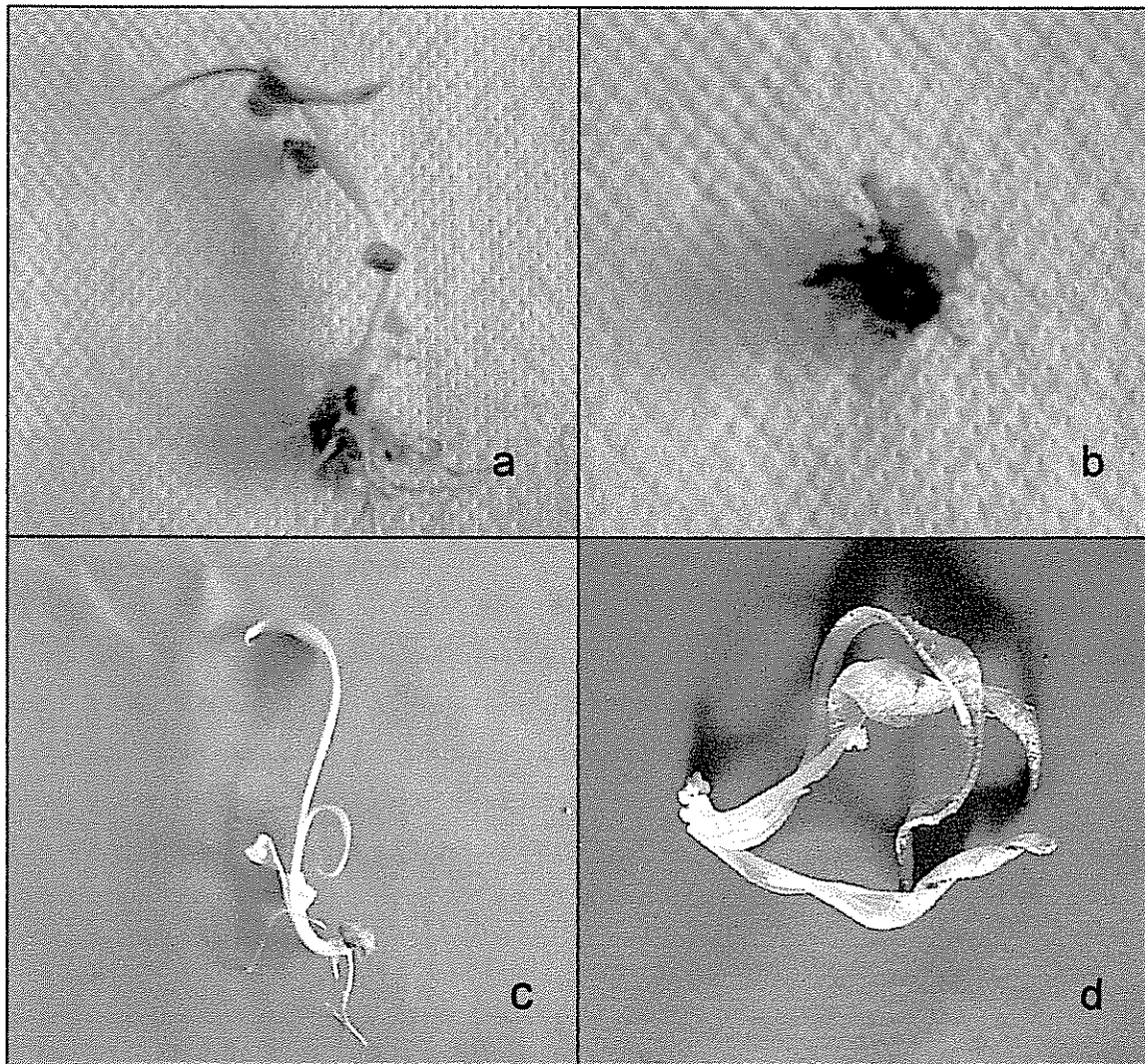


Figura 25. Plántulas de dos cultivares de *Musa* mostrando el fenómeno de hiperhidricidad. a Plántula del cv. 'Curraré' sana. b Plántula del cv. 'Curraré' hiperhídrica. c Plántula sana del cv. 'Dátil'. d Plántula del cv. 'Dátil' mostrando hiperhidricidad.

Estos resultados indican que la cantidad de biomasa presente en el recipiente podría ser un factor que esté influyendo en la hiperhidricidad del material. Posiblemente porque aumenta y conserva el área de la película de medio líquido remanente, durante los periodos en que el material no está expuesto al mismo; o bien, podría deberse a un aumento en la humedad relativa del microambiente de los recipientes, producto de una mayor actividad de intercambio gaseoso entre la atmósfera de cultivo y las plántulas. Sin embargo, no se reportan trabajos que permitan evaluar estas aseveraciones.

Los sistemas de inmersión temporal presentan una disminución de la hiperhidricidad del material, debido a que se reduce el periodo de contacto entre el explante y el medio

líquido y estimula la aireación del microambiente de los recipientes (Alvard *et al.* 1993), lo cual permite que se mantenga una película uniforme del medio en contacto con el explante y no limita el intercambio de gases (Gómez-Kosky 2000). Cabasson *et al.* (1997), utilizó en la regeneración de *Citrus* un sistema de inmersión temporal sin observar hiperhidricidad del material. Así mismo, Etienne y Berthouly (2002), indican que en *Coffea arabica*, la hiperhidricidad es concomitante con los tiempos de inmersión y no con la frecuencia de inmersión. Sin embargo, no se menciona el efecto de la cantidad de biomasa presente en el recipiente sobre la hiperhidricidad del material.

#### 4.5. Aclimatación

Durante esta fase, se trabajó sólo con aquellos tratamientos que presentaron una cantidad suficiente de plántulas, para poder ser llevadas al invernadero. Por esta razón se continuó sólo con las plantas del cv. 'Curraré' obtenidas en el inóculo de 0.5 g, para ambos recipientes (RITA© y Nalgen®), ya que los otros tratamientos no presentaron un número suficiente de plántulas. En el cv. 'Dátil' la cantidad de plántulas desarrolladas fue mínima, por lo que no se aclimató ninguna muestra. Siempre se llevó el tratamiento testigo.

El Cuadro 9. muestra los porcentajes de sobrevivencia de las plantas del cv. 'Curraré' en aclimatación. Se puede observar que para el día de la siembra (primer día) se tienen los valores más altos de sobrevivencia de las plántulas. Esto se debe a que las plántulas no sufrieron ningún daño aparente durante el transplante y la selección previa de las plántulas en cuanto al tamaño y la calidad de las hojas (Figura 26a.), antes de ser llevadas al invernadero, tal y como fue observado en *Ananas* por Escalona *et al.* (1999). La presencia o ausencia de raíz, no fue un parámetro de selección.

Cuadro 9. Promedios de los porcentajes de sobrevivencia (%S) para las plántulas del cv. 'Curraré' obtenidos después de un mes de aclimatación, en los recipientes de inmersión temporal y el testigo, en medio de cultivo semi-sólido.

Tiempo (días)	%S Nalgen®	%S RITA©	%S testigo
1	100.00 ± 0	100.00 ± 0	100.00 ± 0
8	98.33 ± 2.36	98.33 ± 2.36	89.17 ± 3.19
15	95.00 ± 2.36	93.33 ± 4.71	85.83 ± 1.67
22	88.33 ± 2.36	86.67 ± 0	80.83 ± 3.18
29	86.67 ± 0	85.00 ± 2.36	78.33 ± 4.30

En las siguientes tres semanas de cultivo (Figuras 26b., 26c. y 26d.), las plantas se sometieron al estrés de la adaptación a un medio más seco y en el cual los nutrientes son limitados, provocando una disminución en los porcentajes de sobrevivencia (Cuadro 9). Durante la transferencia *ex vitro* las plántulas pueden deteriorarse por el impacto de los cambios súbitos en las condiciones ambientales y en consecuencia un alto porcentaje de las mismas muere durante el periodo de aclimatación (Pospíšilová *et al.* 2000)

Las plántulas provenientes del cultivo en inmersión temporal presentan mejores porcentajes de sobrevivencia, el cual varía entre el 85% y el 87%, esto significa un muy buen porcentaje de aclimatación.

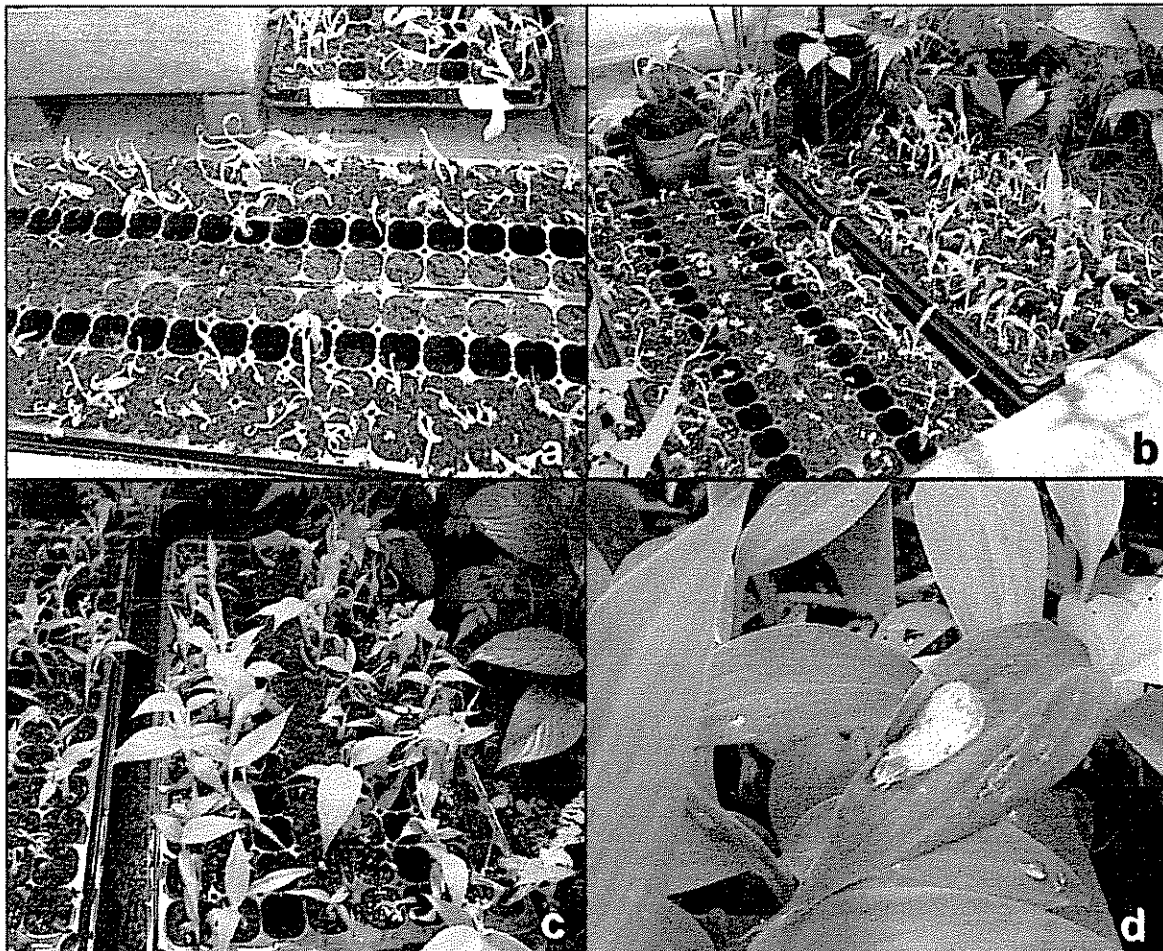


Figura 26. Evolución de las plántulas del cv. 'Curraré', durante la fase de aclimatación. a. Plántulas en el primer día de siembra. b. Plántulas a los ocho días de ser llevadas al invernadero. c. Plántulas a los 22 días de ser transferidas al invernadero. d. Plántulas con un mes de aclimatación.

Los mejores resultados se observan en el recipiente Nalgen® , donde se logró hasta el 86.67% de éxito de sobrevivencia. Con esto se indica un mejor desarrollo y una mayor capacidad adaptativa de las plántulas obtenidas bajo este recipiente de inmersión temporal (Figura 26d.). Posiblemente este recipiente, en términos de forma y del mecanismo de inmersión temporal, puede estar actuando sobre la calidad de las plántulas. Sin embargo, no se indican diferencias estadísticamente significativas con el recipiente RITA© (Figura 1., Anexo 2.), por lo que se puede decir que en términos de adaptación de las plántulas ambos recipientes generan condiciones microambientales semejantes. Para las plántulas provenientes del cultivo en medio semi-sólido, se indica un porcentaje de sobrevivencia del  $78.33 \pm 4.3$ , lo cual es una diferencia estadísticamente significativa. Con esto se indica que las plántulas provenientes de los tratamientos que emplearon los recipientes de inmersión (RITA© y Nalgen®) tienen un mayor éxito durante la aclimatación que aquellas que provienen del tratamiento testigo. Resultados similares son obtenidos en los Laboratorios de Biotecnología del CATIE en Turrialba, Costa Rica, para la aclimatación de embriones somáticos de café (*Coffea arabica*) en recipientes RITA©, donde se manejan porcentajes de sobrevivencia superiores al 80% (Alexis<sup>1</sup> Pereira 2003, conv personal).

Pospislova *et al.* (2000), argumenta que las vitroplántulas provenientes de cultivo '*in vitro*', al ser transferidas al invernadero, poseen un aparato fotosintético deficiente y un desarrollo retardado de la epidermis que disminuye el éxito del proceso adaptativo al medio *ex vitro*. Además, se deben enfrentar a una serie de problemas fitosanitarios y asépticos durante este periodo de re-acomodo al medio exterior (Grout y Millan 1985), debido al retardo en el desarrollo de la cutícula y de las capas epicuticulares (Pospislova *et al.* 2000).

Konstas y Kintzios (2003), lograron la aclimatación de vitroplántulas de *Cucumis sativus* L., desarrolladas en bioreactores tipo "airfift", con un éxito entre el 98 y el 100%. Sin embargo, hay que recalcar que los autores agregaron flurprimidol al  $0,5 \text{ mg l}^{-1}$  al medio de cultivo MS, un bioregulador de la aclimatación que retarda el crecimiento y puede reducir el efecto de la hiperhidricidad en las vitroplántulas. Este suplemento en el medio incide directamente sobre el aumento en el tamaño de las plántulas, la resistencia al estrés y el desarrollo temprano de raíces, lo que aumentó las posibilidades de éxito durante la aclimatación.

---

<sup>11</sup> Pereira. 2003. Comunicació'n Personal. Turrialba, Costa Rica. CATIE

En la Figura 27. se presentan los promedios de la longitud (cm) de las plantas obtenidas en los tres sistemas de cultivo durante un mes. Se puede observar el aumento constante en la longitud de las plántulas, el cual es lento al principio, debido posiblemente al proceso de adaptación después del cambio al nuevo medio de cultivo, como proponen Sha *et al.* (2002) en su trabajo en *Eucalyptus tereticornis*. No obstante, este lento crecimiento semanal, las diferencias en el incremento en la longitud de las plántulas tiene significancia estadística.

El crecimiento es un proceso continuo en la planta, que implica un aumento en volumen, peso y longitud. Es decir, comprende la constante división y alargamiento celular, lo cual forma parte de la dinámica de diferenciación de células, tejidos y órganos a partir de la condición meristemática inicial de un individuo (Flores-Vindas 1999), por lo cual, este valor indica que las plántulas presentaron un crecimiento constante durante el mes en el cual fueron evaluadas.

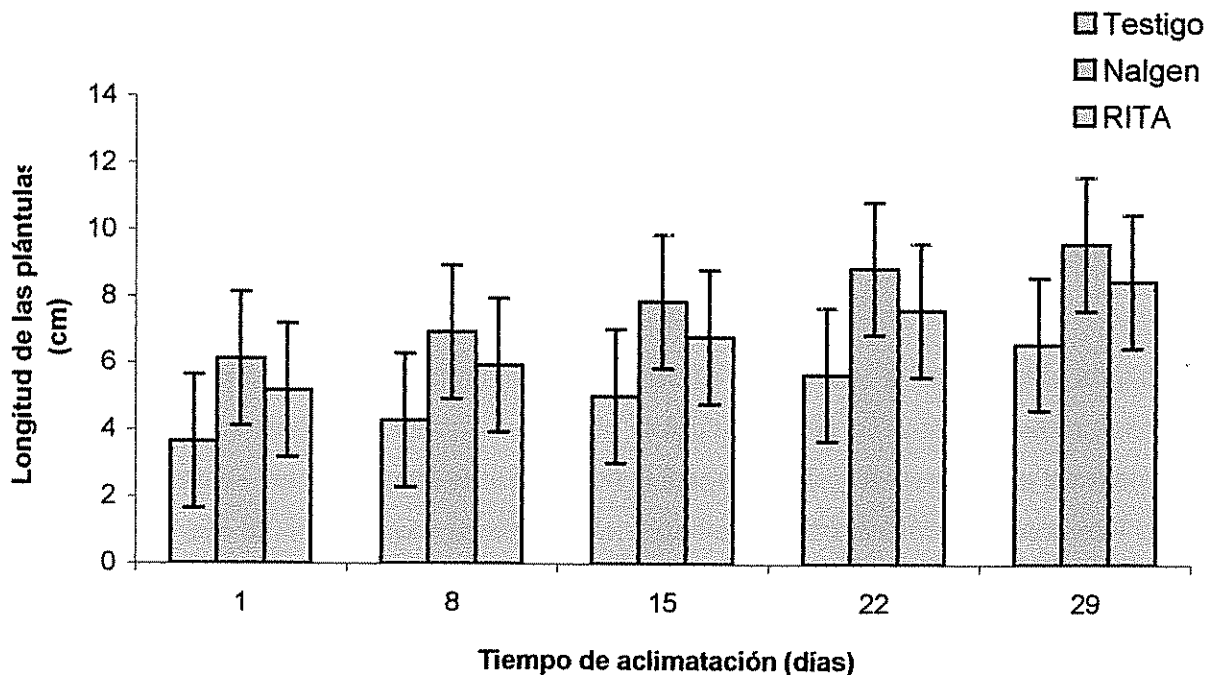


Figura 27. Promedios de la longitud (cm) de las plántulas obtenidas del cv. 'Curraré', en los recipientes de inmersión temporal (RITA® y Nalgen®) y el testigo en medio semi-sólido, durante cuatro semanas de cultivo en la fase de aclimatación.

La prueba de Duncan establece que la mayor diferencia estadística se da principalmente entre el testigo y los dos envases de cultivo en inmersión temporal (Cuadro 8., Anexo 2.).

Konstas y Kintzios (2003) lograron un mayor tamaño en las plántulas obtenidas en el bioreactor 'airlift' y un aumento general de la biomasa. Ellos justifican este fenómeno por la mayor aireación del sistema del bioreactor. Etienne *et al.* (1997) indican que los recipientes de inmersión temporal mantienen una humedad relativa semejante al de las condiciones *ex vitro*, lo cual hace que el ambiente cercano al explante tenga una menor humedad relativa, pero no limita que haya una buena capacidad de flujo de aire (Alvarad *et al.* 1993) y que este ambiente gaseoso sea rico en CO, H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, como cualquier sistema de bioreactor (Ziv 1995).

El efecto del ambiente interno del recipiente de inmersión temporal, es semejante al de la micropropagación fotoautotrófica, y les confiere a las plántulas mejores condiciones morfológicas y fisiológicas para su adaptación a las condiciones del invernadero, que les permite un crecimiento y desarrollo más rápido y vigoroso (Sha *et al.* 2002). Por lo tanto, se espera que el fenotipo inducido sea intermedio entre las plantas obtenidas en ambientes *in vitro* y las plantas obtenidas en invernadero.

Es importante hacer notar que las plántulas del recipiente de Nalgen® presentan mayores valores de longitud (cm), lo cual podría estar relacionado con la forma del recipiente o bien la dinámica del microambiente. Esta respuesta puede reflejar, posiblemente, que la dinámica sea mejor para este recipiente. Sin embargo, las diferencias no son contundentes.

El número de hojas es otro parámetro que permite determinar el crecimiento en plantas y está estrechamente relacionado a la edad biológica de las mismas. La emergencia y el crecimiento de las hojas está asociado con el alargamiento y desarrollo de los metámeros del tallo, que se originan por la elongación y diferenciación del meristemo apical (Flores-Vindas 1999), reflejando un proceso gradual y continuo.

La Figura 28. muestra la distribución del número promedio de hojas desarrolladas en las plántulas aclimatadas, durante un periodo de 30 días. Los resultados muestran un incremento progresivo del número de hojas por plántula. No obstante se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las metodologías de regeneración *in vitro* empleadas (Cuadro 9., Anexo 2.). El testigo presenta el menor número de hojas en el tiempo. Esto se traduce en un menor desarrollo de las plántulas, provenientes del cultivo



en medio sólido, con lo cual sufren de un mayor impacto durante la aclimatación (Pospíšlova *et al.* 2000).

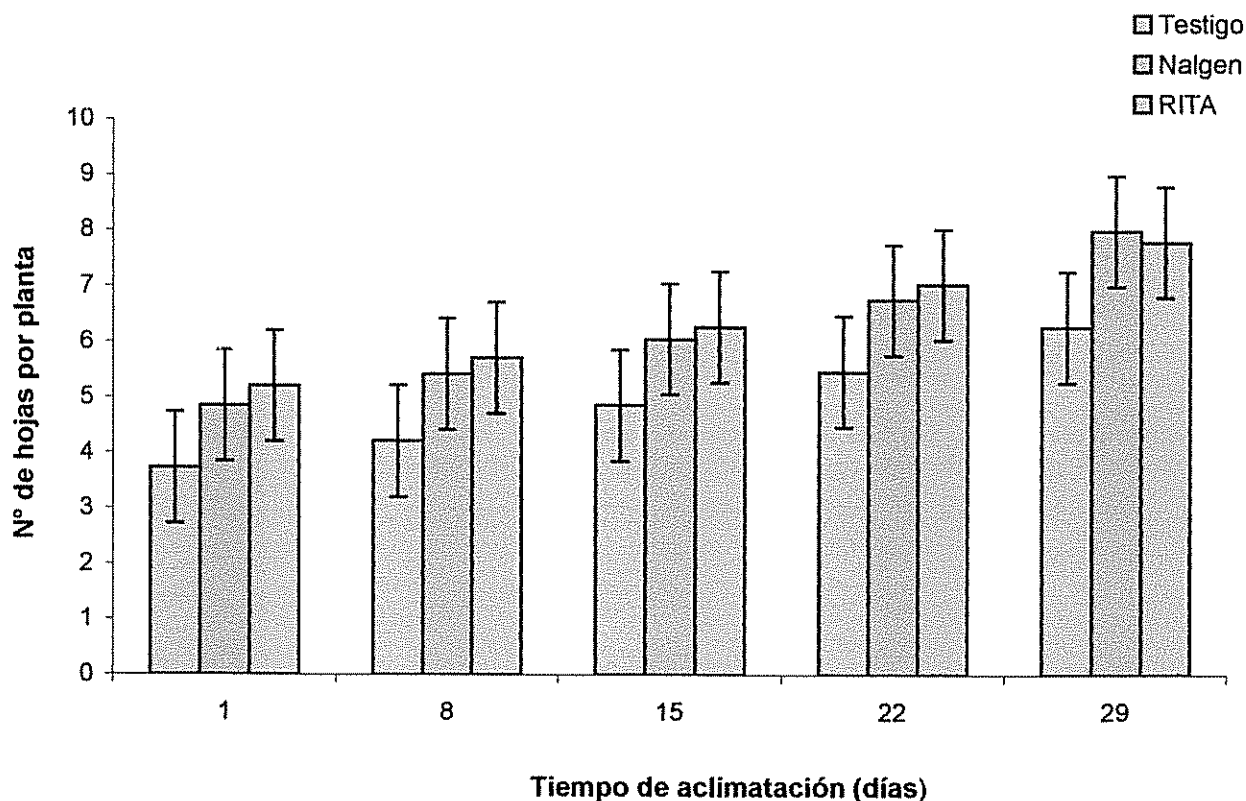


Figura 28. Promedios del número de hojas de las plántulas obtenidas del cv. 'Curraré', en los recipientes de inmersión temporal (RITA® y Nalgen®) y el testigo en medio semi-sólido, durante cuatro semanas de cultivo en la fase de aclimatación.

También se evaluó la cantidad de estomas presentes en la parte adaxial y abaxial de las hojas, para el día de siembra y el último día de evaluación de la aclimatación (un mes).

La cantidad, distribución y forma de los estomas es típico para algunos grupos de plantas (Nobel 1991; Flores-Vindas 1999). Los estomas de monocotiledoneas son del tipo perígeno, en el cual se originan sólo las células oclusivas (Flores-Vindas 1999); tal y como se observó en las muestras evaluadas del cv. 'Curraré'. Las hojas de banano (Figura 29.) son anfiestomáticas, es decir, que poseen estomas tanto en la superficie adaxial de la hoja, como en la abaxial (Sandoval 1994).

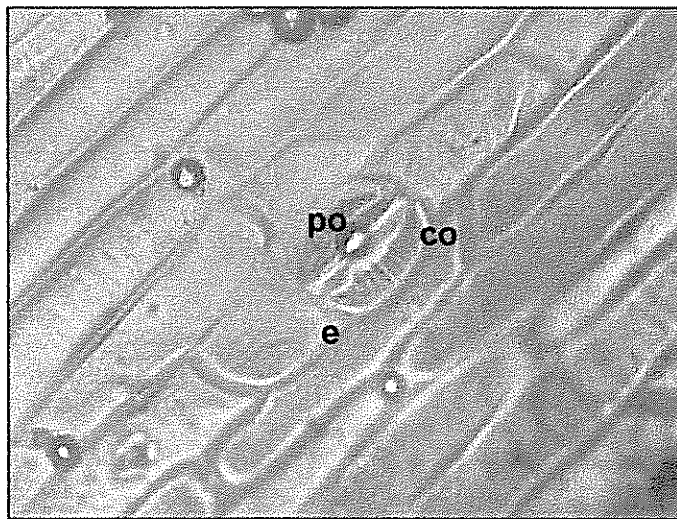


Figura 29. Superficie abaxial de una hoja de plántulas del cv. 'Curraré', mostrando el detalle de un estoma (e) con las células oclusivas (co) que rodean al poro estomático (po). Aumento de 10x.

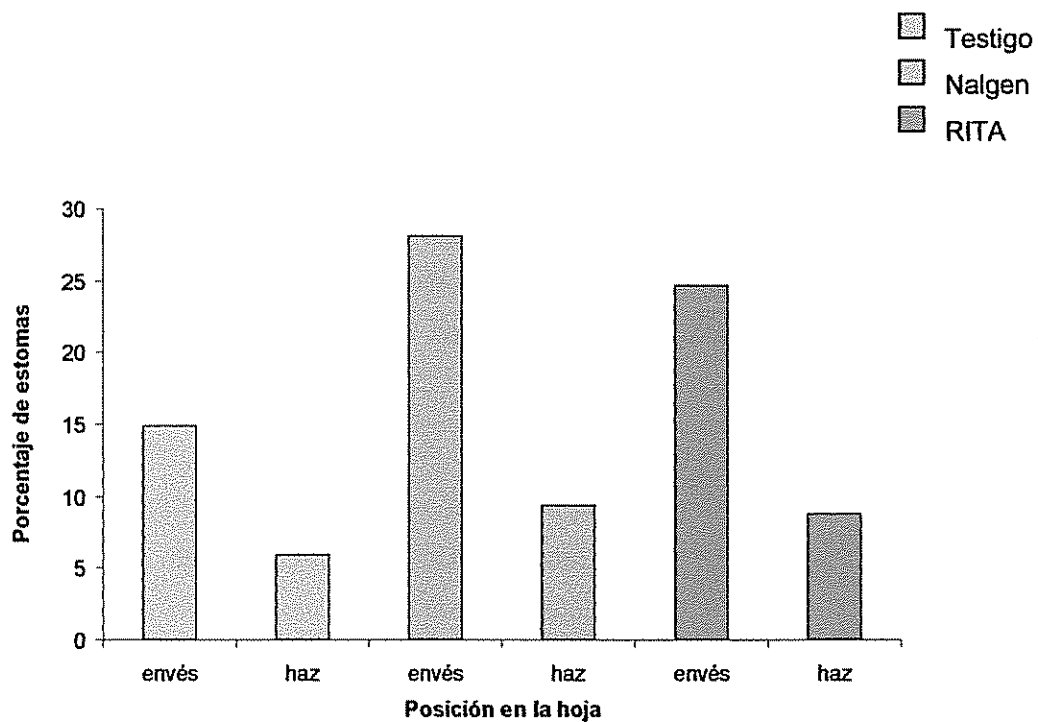


Figura 30. Distribución del porcentaje de estomas presentes en hojas de plantas del cv. 'Curraré', cultivadas en los recipientes (Nalgen® y RITA®) y del testigo en medio de cultivo semi-sólido, según su posición.

En la Figura 30. se muestra el número de estomas presentes en el envés y el haz de las hojas de plántulas evaluadas en cada sistema de cultivo, antes y después de la aclimatación. Estos resultados muestran diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 10., Anexo 2.), indicando una mayor cantidad de estomas en el envés de las hojas.

Nobel (1991) menciona que el número y posición de estomas está claramente definido por premeditación genética; sin embargo hay algunos eventos ambientales que pueden intervenir variando la distribución y la cantidad de estomas presentes en las hojas. Las plantas que se adaptan mejor a climas de alta humedad y radiación solar, tienen mayor cantidad de estomas en el envés que en el haz y es una estrategia de sobrevivencia para evitar la deshidratación excesiva (Taiz y Zeiger 1998), como es el caso de los plátanos y los bananos. Además, se puede esperar que la cantidad de estomas esté estrechamente relacionada con el estado de desarrollo de la planta (Dickison 2000). La mayoría de las plántulas evaluadas tenían una edad cercana a los dos 2 meses y medio; sin embargo el material no tenía una buena sincronía. Este evento genera que las plántulas presenten diferentes estados morfológicos, dándose una variabilidad en los resultados, aunque esto no parece influir sobre los análisis estadísticos.

En la Figura 31., también se observa que la mayor cantidad de estomas está en los dos recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA©) y que ambos no presentan diferencias estadísticamente significativas en sus promedios, según la prueba de Duncan; mientras que la diferencia estadística es marcada entre los recipientes de inmersión temporal y el testigo.

Estos resultados son congruentes con los obtenidos tanto para la longitud (cm) y el número de hojas de las plántulas aclimatadas; así como para el porcentaje de sobrevivencia en el invernadero, con lo cual se refleja que las condiciones que propicia el microambiente de los recipientes de inmersión temporal favorece un mejor desarrollo y crecimiento de las plántulas, permitiendo una adaptación más rápida y efectiva al ambiente de cultivo *ex vitro*.

En cuanto a la diferencia entre el número de estomas entre el día de siembra (día 1) y el día final de la evaluación (día 30) se muestran diferencias estadísticamente significativas.

Este es un evento que se esperaba e indica que las plantas continuaron con su desarrollo normal en el invernadero, mostrando un crecimiento continuo.

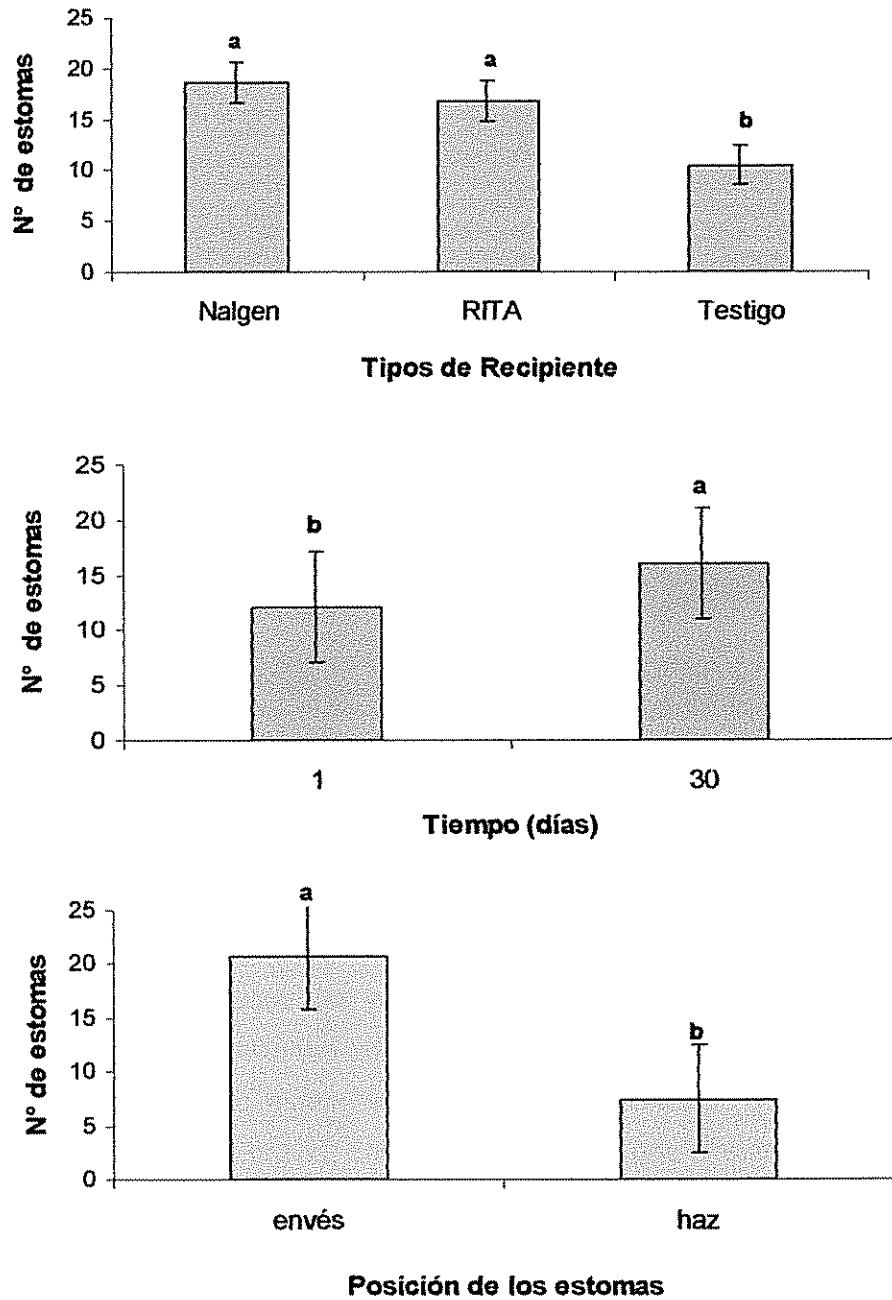


Figura 31. Número promedio de estomas observados en hojas de plántulas del cv. 'Curraré' de acuerdo a la posición (envés y haz), el tiempo de evaluación (día 1 y día 30) y el recipiente de inmersión usado (Nalgen® y RITA®) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido. Las letras pequeñas indican la significancia estadística, según la prueba de Duncan con un  $\alpha$  de .001.

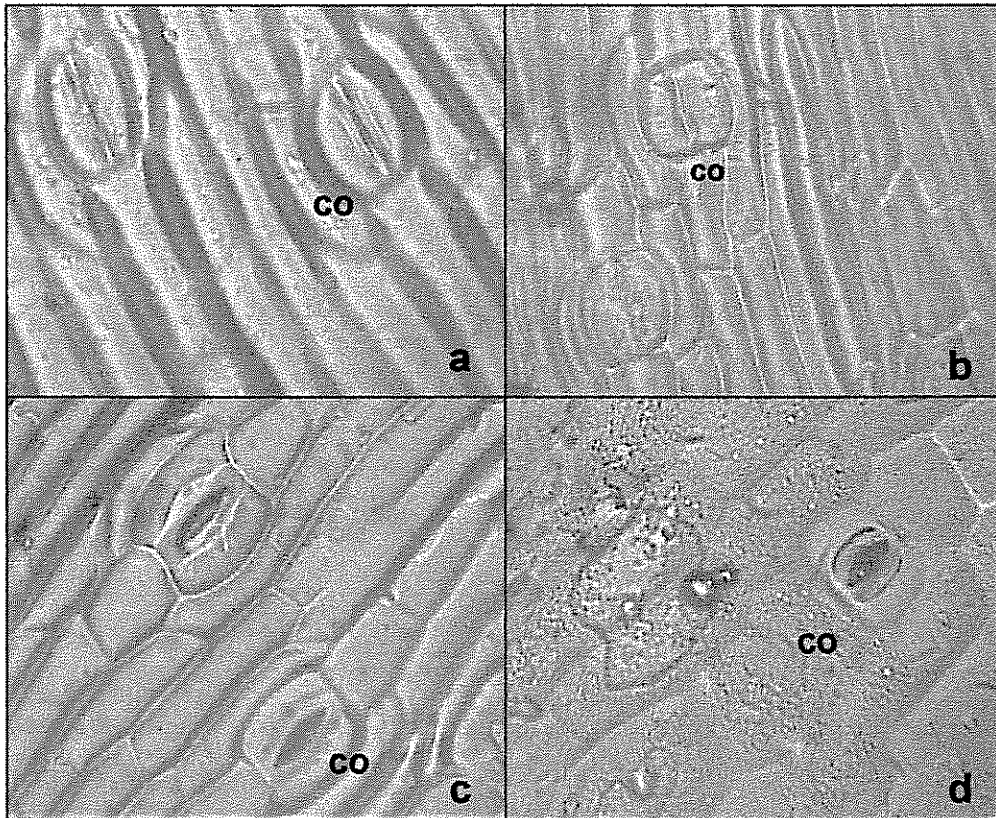


Figura 32. Estomas de plántulas del cv. 'Curraré'. **a.** Estomas en el haz de la hoja antes de la aclimatación (25x). **b.** Estomas en el envés de una hoja antes ser llevados al invernadero (25x). **c.** Estomas del haz de una hoja después 30 días de aclimatación (25x). **d.** Estomas del envés de la hoja de una planta aclimatada (25x).

Un hecho interesante que se pudo observar en las hojas de las plántulas, antes de ser transferidas al invernadero, es que la mayoría de los estomas, tanto del haz como del envés, estaban cerrados (Figura 32a. y 32b.); mientras que los que se evaluaron después de un mes de aclimatación estaban abiertos (Figura 33c. y 33d.). Posiblemente, esto se debe a que los estomas no están completamente funcionales (Sha *et al.* 2002). En condiciones ambientales naturales, cuando se presenta una alta humedad relativa, los estomas se encuentran generalmente abiertos, porque la planta no experimenta deshidratación (Nobel 1991) y bajo las condiciones de alta humedad relativa (cerca al 100%) en el interior de los recipientes de cultivo, es de esperar que los estomas estén abiertos; no obstante se encuentran cerrados. Este hecho puede estar asociado a un pobre desarrollo de los tejidos cuticulares (Pospisilova *et al.* 1999). Además los estomas de plántulas obtenidas bajo condiciones *in vitro* no han desarrollado aún la capacidad de

abrirse y cerrarse, aunque cuentan con células oclusivas con un mecanismo metabólico semejante al de una célula desarrollada en medio *ex vitro*. Este hecho se debe a que no tiene el estímulo de la luz, lo cual los mantiene en un estado de letargo. Además, en plantas creciendo en condiciones de laboratorio, se puede pensar en un menor desarrollo de la cutícula y la epidermis. Sin embargo hay que hacer notar que un número muy bajo, casi insignificante de estomas estaban abiertos, con esta observación se podría cuestionar si estaban funcionales. Pospíšilová *et al.* (1999) menciona que aunque las plántulas en condiciones *in vitro* no tienen sus capas epidérmica y subepidérmica bien desarrolladas, las células oclusivas guardan toda la capacidad metabólica para abrirse.

El estudio histológico de las hojas de plántulas, antes y después de ser cultivadas en el invernadero (Figura 33.), muestra diferencias en cuanto al desarrollo de tejidos. Las hojas tomadas de las plántulas antes de ser aclimatadas (Figura 33a.), presentan mayor cantidad de mesófilo esponjoso y poco desarrollo del mesófilo en empalizada, con células ausentes o muy pequeñas y grandes espacios intercelulares (Sandoval 1994; Pospíšilová *et al.* 1999). La epidermis se presenta delgada, con células subepidérmicas muy turgentes, posiblemente debido a que se localizan en un ambiente más húmedo dentro del recipiente (Sandoval 1994).

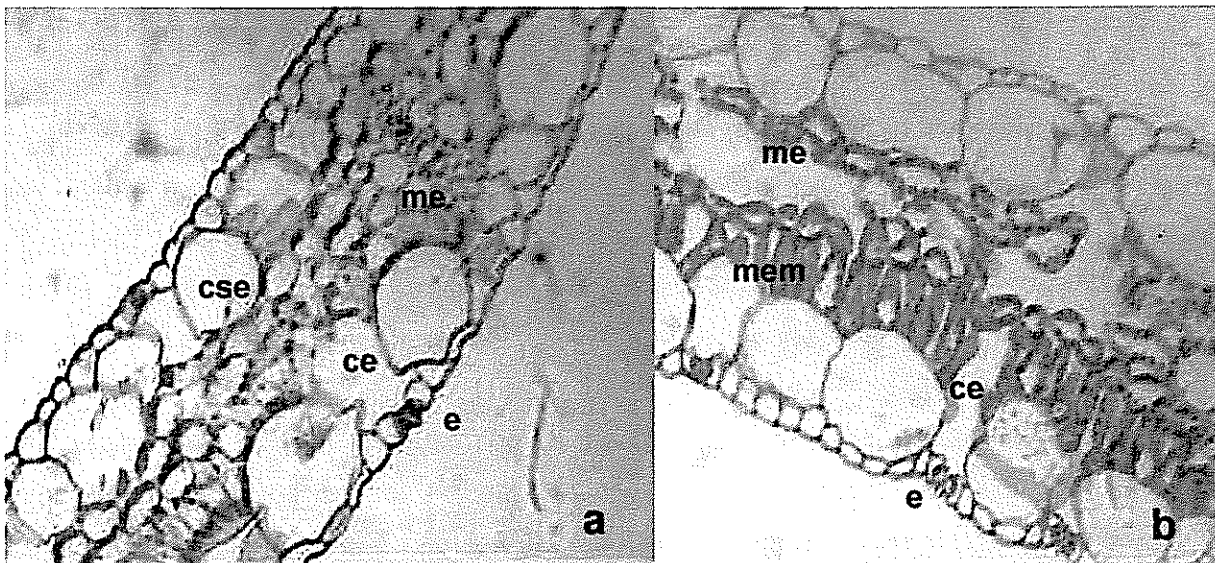


Figura 33. Cortes transversales de hojas de plántulas del cv. 'Curraré', a antes y b. después de un mes de aclimatación. Se observan células epidérmicas (ce) y subepidérmica (cse) en la superficie de la hoja. Para la parte interna se pueden ver diferencias en el desarrollo del mesófilo esponjoso (me) y el mesófilo en empalizada (mem). Además se observan cortes de estomas (e) y de su cámara estomática (ce). Aumento 25x

En las hojas de las plántulas, después de un mes de aclimatadas (Figura 33b.), se observa un mejor desarrollo del mesófilo en empalizada y la presencia de más cloroplastos en sus células. En cuanto a la epidermis, aún se muestran algunas de las células subepidérmicas engrosadas. Posiblemente un mes de aclimatación no sea suficiente para que se dé un mejor desarrollo de la epidermis.

En cuanto a los estomas, se observa un buen desarrollo de las células guardas como de la cámara estomática, en ambas muestras (Figura 33a. y 33b.). Según Desjardins *et al.* (1990), las plántulas provenientes de cultivo *in vitro* presentan estomas en menor número y con un mal funcionamiento, incidiendo en la capacidad fotosintética. Sin embargo, no hay estudios fuertes que sustenten la calidad de los estomas bajo cultivo en inmersión temporal. Pospíšilová *et al.* (1999), sustenta que por lo menos las células guarda tienen la capacidad metabólica para funcionar. Es posible que las condiciones microambientales de los recipientes de inmersión temporal tienda a mejorar el desarrollo del aparato fotosintético.

#### **4.6. ANÁLISIS FINANCIERO**

El análisis financiero se realizó tomando en cuenta cuatro rubros: los costos de los materiales de los medios de cultivo, la aclimatación, los costos por el uso del laboratorio y los valores de los diferentes envases utilizados. Por problemas con la especificación de los costos en la mano de obra, esta fue obviada; sin embargo se debe hacer notar que éste es un rubro de gran importancia para los costos totales de producción. Como fuente de referencia se hizo uso del catálogo Sigma-Aldrich 2003 y las referencias obtenidas en Internet para otros componentes del estudio (CIRAD, Nalgene).

Los costos del uso del laboratorio, se basaron en la tarifa establecida para las capacitaciones impartidas por el Laboratorio de Biotecnología del CATIE, porque era difícil establecer los costos de equipar un laboratorio completo para el trabajo de cultivo en Inmersión Temporal y el método de cultivo en medio semi-sólido. Además el tiempo de producción fue estimado adicionando los períodos de cada fase, más un mes de aclimatación, que fueron los tiempos reales usados.

En el Cuadro 10. se muestran los valores detallados de los gastos, en dólares, para cada uno de los rubros. Para el rubro de "uso del laboratorio", se realizó una distribución estimada del tiempo de trabajo, según la metodología de cultivo *in vitro* evaluada. Además este rubro y el valor de los recipientes de inmersión temporal son los gastos mayores en el proceso. Sin embargo, una vez que se tiene el laboratorio la cantidad de recipientes de inmersión temporal necesarios, los costos de producción disminuyen de manera marcada.

Cuadro 10. Costos de producción de plántulas en los recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA®) y el testigo en medio semi-sólido, para un cultivar.

RUBRO	Inmersión Temporal		Medio semi-sólido	
	Costos por recipiente (\$US)	Costos totales ** (\$US)	Costos por 9 cajas Petri (\$US)	Costos Totales** (\$US)
<i>Componentes de los medios</i>				
Medio M3*	0.18	13.29	0.18	13.29
	0.04*	1.08*	0.02*	1.2*
total	0.22	14.37	0.22	
Medio M4**	0.69	37.15	0.1349	1.21
Medio M5**	0.69	46.67	0.13	14.56
Total	1.60	84.9	0.285	17.97
<b>Aclimatación</b>	2.51	5.02	2.51	5.02
<b>Total de materiales</b>	<b>4.11</b>	<b>89.92</b>	<b>2.795</b>	<b>23</b>
<b>Uso del laboratorio</b>	15	1200	24	250
<b>Recipientes</b>				
Nalgen	165.63	1490,67		
RITA**	101.05	909,45		
caja Petri			0.09	0.89
Envases Gerber			12	108
<b>Total Nalgen</b>	<b>184.74</b>	<b>2180.6</b>		
<b>Total RITA</b>	<b>120.46</b>	<b>1599.37</b>		
<b>Total medio semi-sólido</b>			<b>38.89</b>	<b>381.89</b>

\*Costo en cajas Petri

\*\*BBCMundo.com <http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/business/default.stm>  
20 de noviembre del 2003 (1 Euro = 1.6983 \$)

\*\*\*Costos totales de producción en cada sistema



La producción de plántulas de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' en el sistema de inmersión temporal, usando los recipientes Nalgen® y RITA® y tres inóculos (0.5, 1.0 y 1.5 g) se muestra en el Cuadro 11.

Los costos de los componentes del medio de cultivo fueron obtenidos usando relaciones entre los litros de medio producidos, las cajas Petri empleadas para la fase de regeneración y el número de subcultivos. Un hecho importante de mencionar es que para obtener los inóculos de cultivo (0.5, 1.0 y 1.5 g) durante el inicio de la fase de germinación, se empleó al menos el contenido de la masa embriogénica presente en dos cajas de Petri, información que se tomó en cuenta durante la evaluación de los costos para inmersión. Los costos totales se obtuvieron para cada uno de los sistemas de cultivo *in vitro* usadas (inmersión temporal y cultivo en medio semi-sólido).

Según el Cuadro 10, los costos más altos de producción de plantas se presentan en el cultivo en inmersión temporal. No obstante, el costo de producción es mayor para el recipiente de Nalgen®, con un gasto estimado de \$184.74; mientras que el costo de producción en un RITA® es de \$120.46. Si se realiza una correlación entre las metodologías de cultivo usadas, se obtiene una relación de casi 1 a 6 entre el medio de cultivo semi-sólido y el recipiente Nalgen® y de 1: 5 para el RITA®. Sin embargo, estos costos de producción están más relacionados con la inversión inicial y se espera que los mismos se reduzcan entre un 83.9 y un 89.6%, aunque es importante estimar el deterioro de los recipientes.

En los tratamientos testigo de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' se realizó un conteo total de las plántulas obtenidas. Para este tratamiento se dio una regeneración de 528 plántulas con un peso fresco (PF) promedio, en gramos, por plántula del ámbito de 0.02-0.09 y una relación costo/beneficio de 1.1, es decir que una plántula obtenida bajo este sistema de cultivo tiene un valor cercano a \$ 0.65 US.

Cuadro 11. Número de plántulas estimado, número de plántulas contabilizado y el peso de las plántulas para los cvs. de 'Curraré' y Dátil, para los dos recipientes usados (Nalgen® de Nalgene y RITA®) y tres inóculos (0.5, 1.0 y 1.5 g).

Cultivar	Recipiente	Inóculo (g)	Nº promedio de plántulas por muestra	Peso promedio de 1 plántula (g)	Nº de plántulas estimado	Nº de plántulas obtenido
Curraré	Nalgen	0.5	24.5	0.19	326.7	369
		1	58.5	0.08	1581.4	532
		1.5	41.7	0.11	1111.9	653
Curraré	RITA	0.5	30	0.04	3934.2	298
		1	30.3	0.03	5183.5	517
		1.5	9	0.04	5164.3	597
Dátil	Nalgen	0.5	26.5	0.06	953.8	54
		1	6.5	0.09	1160.2	30
		1.5	0	0.0	0	33
Dátil	RITA	0.5	12	0.07	1099.2	32
		1	4	0.09	970.0	27
		1.5	2	0.09	1915.1	20

En el Cuadro 12. se muestran los valores de la relación de costo/beneficio de los tratamientos evaluados para los cvs. 'Curraré' y 'Dátil', empleando los recipientes de inmersión temporal Nalgen® y RITA® y tres inóculos de cultivo (0.5, 1.0 y 1.5 g). Los costos de producción se presentan por recipiente de inmersión temporal usado. Además se indican los números de plántulas obtenidos por extrapolación de la muestra evaluada y aquellos provenientes del conteo manual de uno de los recipientes por tratamiento.

Los valores de la relación costo /beneficio (c/b) de las plántulas estimadas son más altos para el cv. 'Curraré' que para el cv. 'Dátil', es decir cuesta más producir plántulas del cv. 'Curraré'. Pero hay que tomar en cuenta que el número real de plántulas regeneradas para el cv. 'Dátil' fue mínima, siendo falsos los valores estimados. En la relación de costo beneficio de las plántulas contabilizadas se muestra que fue más caro producir plántulas del cv. 'Dátil'. Como se argumentó con anterioridad esta respuesta del cv. 'Dátil', puede estar relacionada a un desajuste del protocolo, en términos de tiempo, además de la evidencia de embriogénesis secundaria mostrada en el material. Ambos fenómenos pueden estar incidiendo sobre el proceso de regeneración, afectando una mejor sincronía y madurez de los embriones.

Cuadro 12. Relaciones de costo/beneficio (C/B) para los tratamientos de los cultivares 'Curraré' y 'Dátil' empleando los recipientes de inmersión temporal Nalgen® y RITA® y con tres inóculos de cultivo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y los costos de producción por recipiente empleado.

Cultivar	Recipiente	Inóculo (g)	Costo por recipiente (\$)	N° promedio estimado de plántulas por recipiente	Relación c/b	N° contabilizado de plántulas	Relación c/b
Curraré	Nalgen	0.5	184.74	326.69	0.57	369	0.50
		1	184.74	1581.4	0.12	532	0.35
		1.5	184.74	1111.88	0.17	653	0.28
Curraré	RITA	0.5	120.46	3934.19	0.03	298	0.40
		1	120.46	5183.51	0.02	517	0.23
		1.5	120.46	5164.29	0.02	597	0.20
Dátil	Nalgen	0.5	184.74	953.82	0.19	54	3.42
		1	184.74	1160.24	0.16	30	6.16
		1.5	184.74	0	0.00	33	5.60
Dátil	RITA	0.5	120.46	1099.22	0.11	32	3.76
		1	120.46	970.01	0.12	27	4.46
		1.5	120.46	1915.11	0.06	20	6.02

También se observa que los costos de producción de plántulas estimadas por recipiente de inmersión temporal, son más altos para el cv. 'Dátil' en ambos recipientes, esto puede deberse a las razones antes mencionadas. En el cv. 'Curraré' se observa una relación c/b mayor en el inóculo de 0.5 g, tanto para el Nalgen® como para el RITA®; mientras que para el resto de los tratamientos los valores oscilan entre 0.02-0.19, es decir el costo es inferior. Para las plántulas contabilizadas se indica la misma tendencia, sólo que aumentan los costos de producción para todos los tratamientos, con excepción del tratamiento del cv. 'Curraré' en Nalgen® con un inóculo de 0.5 g. Esto se debe a que durante el conteo de las plántulas se obtuvo un número mayor que el número que se estimó. Es importante recalcar que estas plántulas presentaron además un mayor promedio en peso fresco (PF), cercano a los 0.2 g, que el determinado para el resto de los tratamientos. Como se indicó anteriormente esta respuesta del material está correlacionada con un mejor desarrollo de las plántulas, lo cual fue comprobado en el laboratorio.

Otro hecho interesante es que este mismo tratamiento muestra valores muy similares entre el número de plántulas estimadas y el número de plántulas contabilizadas. Con este resultado se podría sugerir que muy posiblemente, si se siguen todas las condiciones del protocolo establecido para este trabajo, se va a obtener un número semejante de plántulas, con un buen desarrollo y un costo por plántula que oscila entre \$0.50 y \$0.57. Sin embargo, se espera que para las siguientes producciones el valor de

una plántula obtenida en este tratamiento del sistema de inmersión temporal tenga un costo estimado entre 0.04 y 0.045 dólares US.

El resto de los tratamientos del cv. 'Curraré', aunque presentan valores menores en la relación costo/beneficio, aún les falta ajuste del protocolo en cuanto al tiempo de cultivo y muy posiblemente al inóculo de siembra. El cv. 'Dátil' definitivamente presentó muchos problemas, afectando los resultados; por lo que es muy apresurado sacar conclusiones.

Haciendo una relación entre los costos de producción de ambos sistemas de cultivo y la cantidad de plántulas estimadas y obtenidas, se puede concluir que bajo las condiciones experimentales utilizadas en el cv. 'Curraré', los costos de producción de los sistemas de inmersión temporal son menores que los del cultivo en medio semi-sólido.

## 5. CONCLUSIONES

1. Las suspensiones celulares embriogénicas de los cultivares 'Dátil' y "Curraré" muestran diferencias en cuanto a su curva de crecimiento, señalando que es más lento para el cv. "Dátil". Esto indica que puede haber diferencias genéticas y fisiológicas en el material; y por lo tanto se debe dar un manejo individualizado a cada cultivar. De esta manera se evita trabajar con un material inmaduro y poco sincrónico que podría repercutir en el resto del proceso de regeneración.
2. El tiempo cultivo requerido durante la fase de regeneración celular pareciera no ser el mismo para ambos cultivares, lo cual lo convierte en un factor que puede incidir en la eficiencia del sistema.
3. Los embriones del cv "Dátil" presentaron un crecimiento en agregado que puede estar estrechamente relacionado con la embriogénesis somática secundaria y la influencia de ésta pudo ser otro factor decisivo en el comportamiento de los embriones del cv "Dátil" durante la fase de germinación, ya que incide en la madurez de los embriones y la sincronía de todo el sistema de cultivo.
4. En los estratos superiores del recipiente de cultivo se favorece el proceso de maduración de los embriones, ya que claramente se observan mayor cantidad de plántulas en desarrollo y de embriones germinados, con respecto a los estratos inferiores del recipiente. Esto podiblemente debido a que existe una disminución en la competencia por luz, espacio y nutrientes. De igual manera, se pudo constatar la sincronía del material en función de los porcentajes de embriones germinados, embriones no germinados y embriones emergidos
5. El mayor incremento en biomasa, para las fases de germinación y desarrollo, se obtuvo con inóculos de 1.0 y 1.5 g, lo cual indica que a mayor masa inicial, mayor masa final; pero no se relaciona con el grado de germinación y de sincronización del material. No obstante, se observó un incremento directamente proporcional de la hiperhidricidad.
6. El tratamiento testigo del cv "Dátil" presentó una buena germinación de embriones, sin embargo, presentó un retroceso durante la fase de desarrollo dirigido hacia la vía de callogénesis. Las causas de este comportamiento se desconocen

7. En el cv "Curraré", se mostró un mayor porcentaje de germinación y número de plantas desarrolladas en el recipiente de inmersión temporal RITA®, con inóculos de 0.5 y 1.0 g, lo cual muestra que a menor densidad de siembra se da un menor nivel de competencia por espacio, luz y nutrientes
8. Las plántulas obtenidas en ambos recipientes de inmersión temporal presentan una alta calidad, sin embargo aquellas producidas en el recipiente Nalgen® de Nalgene tenían un mayor tamaño y desarrollo. Este hecho puede estar relacionado con la forma del mismo, que separa el ambiente en el cual se encuentra el material del medio líquido.
9. A pesar de que las plántulas obtenidas en inmersión temporal tuvieron frecuencias bajas de daños y malformaciones, la etiolación es un factor constante sobretodo en los estratos inferiores de los recipientes. Esto denota una alta competencia por luz y espacio.
10. Los embriones del cv. "Curraré" presentaron mayor oxidación que los cv "Dátil", debido posiblemente a que el primero produce mayor concentración de fenoles.
11. La ventaja de la inmersión temporal sobre el cultivo en medio semi-sólido es que tiene un potencial mayor de multiplicación expresado en corto tiempo.
12. El porcentaje de sobrevivencia en aclimatación fue mayor para las plantas obtenidas en inmersión temporal. Este hecho puede deberse a que en este sistema se promueve un mejor desarrollo de las mismas y mayor capacidad adaptativa en el ambiente *ex vitro*.
13. Las plántulas obtenidas en medio de cultivo semi-sólido presentan estomas menos desarrollados, lo cual significa que el cultivo en inmersión temporal puede ser considerada como una fase de pre-aclimatación.
14. Los cortes histológicos realizados en las plántulas desarrolladas y aclimatadas, mostraron que las vitroplántulas no presentan diferencias entre el mesófilo esponjoso y el de empalizada, lo que posiblemente esté relacionado con su poca actividad fotosintética.

## 6 RECOMENDACIONES

- Profundizar acerca del efecto de la edad de las suspensiones celulares embriogénicas, tiempo de regeneración y concentraciones de los reguladores de crecimiento que permitan definir el estado ideal de los embriones globulares, para ser llevados a germinación .
- Establecer mejor los tiempos de cultivo de las suspensiones celulares embriogénicas para optimizar los protocolos de inmersión temporal en ambos cultivares.
- Evaluar menores densidades de inóculo a las usadas en este estudio, que permitan optimizar un protocolo en inmersión temporal más eficiente en cada cultivar.
- En el caso de emplear inóculos de alta densidad (1.5 g), se recomienda realizar subcultivos durante la fase de germinación y desarrollo para garantizar el máximo aprovechamiento del material embriogénico.
- Evaluar el efecto del tamaño de las plantas llevadas a aclimatación con el fin de mejorar los porcentajes de sobrevivencia *ex vitro*.
- Realizar un estudio económico financiero más extensivo, que incluya los gastos de mano de obra y profundice en los costos del uso del laboratorio, para así obtener datos más ajustados a los costos reales de producción.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Akita, M., Takayama S. 1994. *Stimulation of potato (Solanum tuberosum L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control*. Plant Cell Reports. 13: 184- 187.
- Akula, A., Becker, D., Bateson, M. 2000. *High-yielding repetitive somatic embryogenesis and plant recovery in a selected tea clones, "TRI-2025", by temporary immersion*. Plant. Cell. Rep. 19: 1140-1145.
- Alvard, D., Côte, F., Teisson, C. 1993. *Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation: Effects of temporary immersion of explants*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 35: 55- 60.
- Ammirato, P. 1987. *Organizational events during somatic embryogenesis*. En Plant Tissue and Cell Culture. Vol III. Alan R. Liss. Inc. New York, USA. pp 57-81.
- Ammirato, P. 1989. *Embryogenesis*. In Handbook of Plant Cell Culture. Vol II. Macmillan Press. New York, USA. pp 82-123.
- Arnold von, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., Filonova, L. 2002. *Developmental pathways of somatic embryogenesis*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 69: 233-249.
- Assani, A., Haicour, R., Wenzel, G., Côte, F., Bakry, F., Foroughi-Wehr, B., Ducreux, G., Aguilar, ME., Grapin, A. 2001. *Plant regeneration from protoplasts of dessert banana cv. Grande Naine (Musa spp., Cavendish sub-group AAA) via somatic embryogenesis*. Plant Cell Rep. 20: 482- 488.
- Bermúdez, I., Orellana, P., Pérez, J., Ponce, J., Clavero, J., Veitia, N., Romero, C., Mujica, R., Gacia, R. 2000. *Mejoramiento del clon híbrido de plátano FHIA-21 con el uso de la mutagénesis in vitro*. INFOMUSA 9(1): 16-19.
- Bieberach, CY. 1995. *Embriogénesis somática y regeneración de plantas en cultivares de Musa sp*. Tesis de Maestría. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 86p.
- Bunga, JM., von Aderkas, P: 1992, *In vitro culture of tree*. Forestry Science. Vol 38. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. pp 114-116.
- Cabasson, C., Alvarad, D., Dambier, D., Ollitrault, P., Teisson, C. 1997. *Improvement of Citrus somatic embryo development by temporary immersion*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 50: 33-37.
- Castro, D., Días, J., Montoya, N. 2002. *Propagación clonal de bananos en bioreactores de inmersión temporal*. Acrobat XV reunión internacional. 44- 47p.
- CIRAD. 2002. *Desarrollo y germinación de embriones somáticos. 700 hasta 1000 plántulas por RITA® listas para ser aclimatadas*. (on line). Revisada el 3 de noviembre del 2000. [cirad.fr/produits](http://cirad.fr/produits)
- Côte, FX., Domergue, R., Monmarson, S., Schwendiman, J., Teisson, C., Escalant, JV. 1996. *Embryogenic cell suspensions from the male flower of Musa AAA cv. Grand nain*. Physiologia Plantarum. 97: 285- 290.



- Côte, FX.; Teisson, C., Perrier, X. 2001. Somaclonal variation rate evolution in plant tissue culture: contribution to understanding through a statistical approach. *In Vitro. Cell. Dev. Biol.- Plant.* 37: 539-542.
- Cronauer-Mitra, S., Krikorian, AD: 1983. *Somatic embryos from cultured of triploid plantains (Musa sp.)*. *Plant Cell. Reports* 2: 289- 291.
- Cronauer-Mitra, S., Krikorian, AD: 1988. *Plant regeneration via somatic embryogenesis in the seeded diploid banana Musa ornata Roxb.* *Plant Cell Reports.* 7: 23- 25.
- Dadzie, BK., Orchard, JE. 1997. *Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos.* International Plant Genetic Resource Institute. INABAP. Montpellier, Francia. 63p.
- Daniells, J., Jenny, C., Karamura, D., Tomekpe, K. 2001. *Musalogue: a catalogue of Musa germplasm. Diversidad in the genus Musa.* IPCR. INIBAP. Montpellier, France. 213p.
- Debergh, P., Harbaoui, Y., Lemeur, R. 1981. *Mass propagation of globe artichoke (Cynara scolymus): evaluation of different hypothesis to overcome vitrification with special reference to water potencial.* *Physiol. Plant.* 53: 181- 187.
- De Fera, M., Jiménez, E., Barbón, R., Capote, A., Chávez, M., Quijala, E. 2000. *Multipliación de suspensiones celulares embriogénicas de Coffea arabica cv Catimor 9722.* *Bioteología Vegetal.* 1: 13- 20.
- Desjardins, Y., A. Gosselin, and M. Lamarre. 1990. *Growth of transplants and invitro-cultured clones of asparagus in response to CO2 enrichment and supplemental lighting.* *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115(3):364-368.
- Dickson, W.C. 2000. *Integrative plant anatomy.* Academic Press. Nueva York. USA. 765p.
- Dhed'a, D., Dumortier, F., Panis, B., Vuylsteke, D., de Langhe, E. 1991. *Plant regenration in cell suspension cultures of the cooking banana cv "Bluggoe" (Musa spp. ABB group).* *Fruits.* 46 (2): 125- 135.
- Escalant, JV.; Teisson, C. 1988. *Embryogenèse somatique chez Musa sp.* *Physiologie végétale.* 306 (III): 277- 281.
- Escalant, JV.; Teisson, C. 1989. *Somatic embryogenesis and plant from immature zygotic embryos of the species Musa acuminata and Musa balbisiana.* *Plant Cell Reports.* 7: 665- 668.
- Escalant, JV., Teisson, C., Côte, F. 1994. *Amplified somatic embryogenesis from male flowers of triploid banana and plantain cultivars.* *In vitro Cell. Dev. Biol.* 30: 181- 186.
- Escalant, JV., Côte, F., Grapin, A., Auboiron, E., Legavre, T., Lagoda, P.; Careel, F., Bakry, F., Kerbelec, F., Teisson, C., Tèzenas du Montcel, H. 1994b. *Biotechnologie for Musa improvement-stratedies and resultat. En: Banana and plantain breeding: priorities and strategies.* INIBAP. Montpellier, Francia. 55p.
- Escalona, M., Lorenzo, J.C., Gonzales, B., Daquinta, M., Gonzales, J.L., Desjardins, Y., Boroto, C.G. 1999. *Pineapple (Ananas comosus L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems.* *Plant. Cell. Rep.* 18: 743- 748.

- Espinosa, P., Lorenzo, J.C., Iglesia, A., Yabor, L., Menéndez, E., Borroto, J., Hernández, L., Arencibia, A.D. 2002. Production of pineapple transgenic plants assisted by temporal immersion bioreactors. *Plant. Cell. Rep.* 21: 136-140.
- Etienne, H., Bertrand, B., Anthony, F., Côte, F., Berthouly, M. 1997. *L'embryogenèse somatique: un outil pour l'amélioration génétique du caféier*. *Agronomie. ASCI* 17: 457-465.
- Etienne, H., Bertrand, B., Lartaud, M., Michaux-Ferrière, N., Carron, M.P., Berthouly, M., Teisson, C. 1997b. *Improvement of somatic embryogenesis in Hevea brasiliensis (Müll. Arg.) using the temporary immersion technique*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 33: 81-87.
- Etienne, H., Bertrand, B., Vásquez, N. 1999. *Plant regeneration by direct sowing of Coffea arabica somatic embryos mass-produced in a bioreactor*. En actas de la IV Semana Científica "Logros para la investigación del nuevo milenio". CATIE. Turrialba, Costa Rica. pp 64-67.
- Etienne, H., Bertrand, B., Barry-Etienne, D., Vásquez, N., Berthouly, M., 1999b. *Aportes de la Biotecnología al mejoramiento genético del café: el ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F1 en América Central*. In *Desafíos de la caficultura Centroamericana*. Bertrand, B., Rapidel, B. Editorial AGROAMERICANA. CIRAD-IRD-IICA. San José. Costa Rica. 456493p.
- Etienne, H., Berthouly, M., 2002. *Temporary immersion systems in plant micropropagation*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 69: 215- 231.
- Evans, D., Sahrp, W., Flick, Ch. 1981. Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. In *Plants tissue culture. Methods and applications in agriculture*. Ed Trevor A. Thorpe. Academic Press. EEUU. pp: 451-113.
- FAO. 2002. *La biotecnología y la producción de banano*. (on line) Segunda reunión . San José, Costa Rica. Revisado el 16 de diciembre del 2002 [www.fao.org/biotech](http://www.fao.org/biotech)
- FAO. 2002b. Datos Agrícolas de FAOSTAT. FAO. <http://apps.fao.org> (on line) Revisado el 3 de noviembre del 2003.
- Finstand, K., Brown, D., Joy, K. 1993. *Characterization of competence during induction of somatic embryogenesis in alfalfa tissue culture*. *Plant cell, Tissue and Organ Culture*. 34: 125-132.
- Firoozabady, E y Gutterson, N. 2003. *Cost-effective in vitro propagation methods for pineapple*. *Plant. Cell. Rep.* 21: 844-850.
- Flores v., E:M. 1999. *La planta: estructura y función*. Vol I. Libro Universitario Regional. Cartago, Costa Rica. 23-30p.
- Georget, F., Domergue, R., Ferrière, N., Côte, F.X. 2000. *Morphohistological study of the different constituents of a banana (Musa AAA, cv. Grande naine) embryogenic cell suspension*. *Plant Cell Reports*. 19: 748-754.
- Giménez, A., de García, E., Xena de Enrech, N., Blanca, I. 2001. *Somaclonal Variation in Banana: Cytogenetic and Molecular characterization of the somaclonal variant CIEN BTA-03*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.\_Plant #/:* 217-222.

- Gómez-Kosky, R., Gilliard, T., Barranco, LA., Reyes, M. 2000. *Embriogénesis somática en medios líquidos. Maduración y aumento de la germinación en el cultivar híbrido FHIA-18 (AAAB)*. INFOMUSA 9(1): 12- 16.
- Gómez-Kosky, R., de Fera, M., Posada, L., Gillard, F., Martínez, B., Reyes, M., Chávez, M., Quijano, E. 2002. Somatic embryogenesis of the banana hybrid cultivar FHIA-18 (AAAB) in medium and scaled-up in a bioreactor. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 21-26.
- Gonzaga, L. 2001. *Embriogénesis somática y su aplicación en la propagación de plantas*. Cap IV. Universidad Tecnológica de Pereira. Laboratorio de Biotecnología. Pereira, Colombia. p14.
- Grout, BWW., Millam, S. 1985. *Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting*. *Annals of Botanic* 55: 129- 131.
- Grapin A., Schwendiman J., Teisson C., 1996. *Embriogénesis somática en plátanos y llantenes. Célula In vitro*. Revelador. *Biol. Planta* 32:66.
- Grapin, A., Ortiz, JL., Domergue, R., Babeau, J., Monmarson, S., Escalant, JV., Teisson, C., Côte, F. 1998. *Obtención e callos embriogénicos, iniciación y regeneración de suspensiones celulares embriogénicas a partir de flores inmaduras maculinas y femeninas de Musa*. INFOMUSA. 7(1): 13- 15.
- Grapin, A., Ortiz, JL., Lescot, T., Ferrière, N., Côte, FX. 2000. *Recovery and regeneration of embryogenic culture from female flowers of false horn platan*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 61: 237- 244.
- Halperin, W. 1991. *Attainment and Regeneration of Morphogenetic Capacity In vitro*. *Plant Tissue Culture Manual*. pp:3-47.
- INIBAP. 1997. *Annual Report. International Network for the Improvement of Banana and Plantain*. Francia.
- INIBAP. 2001. *Diversidad de los bananos*. INIBAP. IPGRI. Montpellier, Francia. pp 1- 2.
- Kee-Yoeup Paek., Eun-Joo Hahn., Sung.Ho Son. 2001. *Application of bioreactors for large-scale micropropagation systems of plants*. *In vitro cell. Dev. Biol\_ Plant* 37: 149-157.
- Khalil, SM., Cheah, KT., Pérez, EA., Gaskill, DA., Hu, JS. 2002. *Regeneration of banana (Musa spp. AAB cv. Dwarf Brazilian) via secondary somatic embryogenesis*. *Plant Cell Rep.* 20: 1128- 1134.
- Konstas, J., Kintzios, S., 2003. *Developing a scale-up systems for the micropropagation of cucumber (Cucumis sativus L.): the effect of growth retardants, liquid culture and vessel size*. *Plant Cell Rep.* 21: 538-548.
- Kozai, T., Iwanami, Y., Watanabe, K., Watanabe, I. 1991. *Photoautotrophic and phototrophic growth of strawberry plantlets in vitro and changes in nutrient composition of the medium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 107- 115.
- Kozai, T., Kubota, C., Ryoung, B. 1997. *Environmental control for the large-scale production of plants through in vitro Techniques*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 51: 49- 56.

- Kraus, U., Soberanis, W., Jarra, J. 2001. *Evaluación de los híbridos de la FHIA en comparación con los clones de Musa locales en una zona libre de Sigatoka negra en Perú oriental*. INFOMUSA 10(1): 21-26.
- León, J. 2000. *Botánica de los cultivos tropicales*. 3<sup>era</sup> Edición rev y aum.. Editorial Agroamérica. IICA. San José, Costa Rica. pp 461- 471.
- Lerma, S.L., Acuña, P., Riveros, A.S., Sandoval, J.A. 2002. *Tasa de multiplicación y potencial de regeneración de embriones somáticos de una suspensión celular de banano (Musa AAA cv. "Gran Enano")*. INFOMUSA. 11(1): 41- 44.
- López, J., Montano, N., Swennwn, R., Ventura, J., Schoofs, H., Medero, V., García, M., Espinosa, L., Cabrera, M. 2000. *Establecimiento de suspensiones celulares en plátanos vianda del grupo (AAB)*. Biotecnología Vegetal. 1: 59- 62.
- Lorenzo, C.J., González, B.J., Escalona, M., Teisson, C., Espinoza, C., Borroto, C. 1998. *Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion systems*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 54: 1997- 200.
- Ma, S.S., 1991. *Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension culture in banana*. In *Proceedings of symposium on tissue culture og horticultural crops*. Taipei, Taiwan held in 8-9<sup>th</sup> march, 1988. National Taiwan University: 181-188p.
- Marroquín, C.G. 1991. *Suspensiones celulares y embriogénesis somática*. Tesis de Maestría. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 114p.
- Mavituma, F. Y Buyukalaca, S. 1996. *Somatic embryogenesis of pepper in bioreactors: a study of bioreactor type and oxygen-uptake rates*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 327-333.
- Mayor, M.L., Nestares, G., Zorzoli, R. Picardi. L.A. 2003. *Reduction of hyperhidricity in sunflower tissue culture*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 72: 99- 103.
- Megía, R., Haïcour, R., Tizroutine, S., Bui Trang, V., Rossignol, L., Sihachakr, D., Schwendiman, J. 1993. *Plant regeneration from culture protoplast of the cooking banana cv. Bluggoe (Musa spp., ABB group)* Plant. Cell reports 13: 41-44.
- Molina, M.E.: 1987. *Plantas de cultivo de tejidos y de reproducción rápida, una alternativa para obtener material libre de nemátodos*. ASBANA 13 (32): 14-19.
- Murashige, T y Skoog, F. 1962. *A revised medium for rapid growth and biossays with tabacco tissue culture*. Physiol. Plant. 15: 473- 497.
- Narayanaswamy, S. 1977. *Regeneration of Plants from Tissue Cultures*. In Plant Cell, Tissue and organ culture. Edit Reinert, J. Y Bajaj, Y. P.S. New York, USA. pp179-248.
- Nobel, P.S. 1991. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. Academic Press. New York, EUA. 578p.
- Novak, F.J., Afza, R., Van DM., Perea, DM., Conger, BV., Tang, X. 1989. *Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspensiones cultures of dessert (AA and AAA) and cooking (ABB) banana (Musa sp.)*. Bio/Technology. 1: 154- 159.

- Ortíz, J.L. 2001. *Desarrollo de una metodología para la transformación genética de banano (cv "Gran Enano") y plátano (cv "Curraré") de consumo local para introducir resistencia a la Sigatoka Negra" (Mycosphaella fijiensis)* Tesis de Maestría. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 114p.
- Pâques, M., Boxus, Ph. 1987. *Vitrification: review of literature*. Acta Horticulturae. 212: 155-166.
- Pâques, M. 1991. *Vitrification and micropropagation: causes, remedies and prospects*. Acta Horticulturae. 289: 283- 290.
- Pérez, M., Ramírez, R., Núñez; H., Ochoa, N. 1999. *Introducción al cultivo de tejidos*. Universidad Autónoma de Aguas Calientes. México. 179p.
- Pérez, JN., Suárez M., Orellana, P. 2000. *Posibilidades y potenciales de la propagación masiva de plantas en Cuba*. Biotecnología Vegetal. 1: 1- 12.
- Pérez, N., de Feria, M., Jiménez, E., Capote, a., Chávez, M., Quijala, E. 2001. *Empleo de Sistema de Inmersión para la producción a gran escala de tubérculos "in vitro" de Solanum tuberosum L. var Atlantic y estudio de su comportamiento en el campo*. Biotecnología vegetal. j: 17-21.
- Picq, C., Fouré, E., Frison, EA (editors). 1999. *Bananas and Food Security: les productions bananière: un enjeu économique majeur pour la sécurité alimentaire*. International Symposium, Doula, Cameroon 1998. IPGRI. INIBAP. CTA. CRBP. International Network for the Improvement of Bananas and Plantain. Montpellier, Francia. 797p.
- Pospíšilova, J., Tichá, I., Kadlecěk, P., Haisel, D., Plazáková, S. 1999. *Acclimatation of micropropagated plants to ex vitro conditions*. Biologia Plantarum 42 (4): 481-497.
- Pospíšilova, J., Haisel, D., Synkova, H., Catsky, J., Wilhelmova, N., Plzakova, S., Prochazkova, S., Sramek, F. 2000. *Photosynthetic pigments and gas exchange during ex vitro acclimation of tobacco plants as affected by CO2 supply and abscisic acid*. Plant Cell, Tissue and organ Culture 61: 125- 133.
- Roche. TD: 1996. *Commercial-scale photo-autotrophic micropropagation: aplicaciones in-irish agriculture, horticulture and forestry*. Acta Hort. 400: 515- 519.
- Rosales, FR. Y Pocasangre, LE. Sf. *Mejoramiento convencional de banano y plátano: estrategias y logros*. Red internacional para el mejoramiento del banano y el plátano (INIBAP). Documento. CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Rossell, C. 1990. *Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales*. FAO. Roma, Italia. 112p.
- Scowcroft, W.R., Larkin, P.J. 1982. *Somaclonal Variation: A new option for plant improvement. In Plant Improvement and Somatic Cell Generics*. Ed I. Vasil, W.R. Scowcroft, K. J: Frey. Academic Press. EEUU: pp: 159-178.
- Sandoval, JA. 1994. *Foliar Morphology and anatomy of Musa cv. "Grande Naine" (AAA) plants grown in vitro and during hardening as compared to field-grown plants*. Fruits 49(1): 37-46.

- Sha Valli Khan, PS., Kosai, T., Nguyen, QT., Kubota, C., Dhawan, V. 2002. *Growth and net photosynthesis rates Eucalyptus tereticornis Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation condicions*. Plant Cell, Tissue and Culture 71: 141-146.
- Smith, N.J.H., Williams J.T., Plucknett, D.L. y J.P. Talbot. 1992. *Tropical forest and their crops*. Cornell Universidad Prensa: Ithaca, U. S. A. pp 264- 311.
- Simmonds, N.W., 1987. *Classification and breeding of Banan and plantain breeding strategies*. ACIAR Proceeding Series, Australia. 21: 69-73.
- Solano, W. 2001. *Efecto de las características de cultivo en suspensión celular y en bioreactor con inmersión temporal sobre la propagación masiva de Coffea arabica por embriogénesis somática*. Tesis de Licenciatura con énfasis en Fitotecnia. UCR. Turrialba, Costa Rica. 86p.
- Soto, M. 1992. *Banano: cultivo y comercialización*. 2<sup>da</sup> Edición rev. y aum. Litografía e Imprenta LIL, S. A. San José, Costa Rica. 649p.
- Swamy, RD. , Srinivasa, NK., Chacko, EK: 1983. *Tissue-culture propagation of Banana*. Scientia Horticulturae. Pp 247- 252.
- Taiz, L., Zeiger. E. 1998. *Plant Physiology*. 2<sup>da</sup> Edición. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Massachusetts, EUA. 792p.
- Teisson, C. y Alvarad, D. 1994. *A new concept of plant in vitro cultivation liquid medium: tempory immersion*. VII Int. Congress IAPTC. Firenze. Book of Abstracts. pp 25.
- Teisson, C., Alvarad, D., Berthouly, B., Côte, F., Escalant, JV., Etienne, H., Lartaud, M. 1996. *Simple apparatus to perform plant tissue culture by tempory immersion*. Acta Hort. 400: 521- 526.
- Thorpe, T. 1994. *Morphogenesis and Regeneration*. Plant Cell and Tissue Culture. Parte A. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. pp:17-36.
- Zamarripa, A., Ducos, JP., Bollon, H., Dufour, M., Petiard, V., 1991. *Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide: effects densité d'inoculation et renouvellement du milieu*. Café, Cacao, Thé vol XXXV, 4: 233-243.
- Zhao, J., Zhou, C., Yang. HJ. 1999. *In vitro develoment of proembryos and plant regeneration via microculture in Oryza sativa*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 55: 167- 174.
- Ziv, M. 1995. *The control of bioreactor environment for plant propagation in liquid culture*. Acta Horticulturae. 393: 25-38.

# ANEXOS

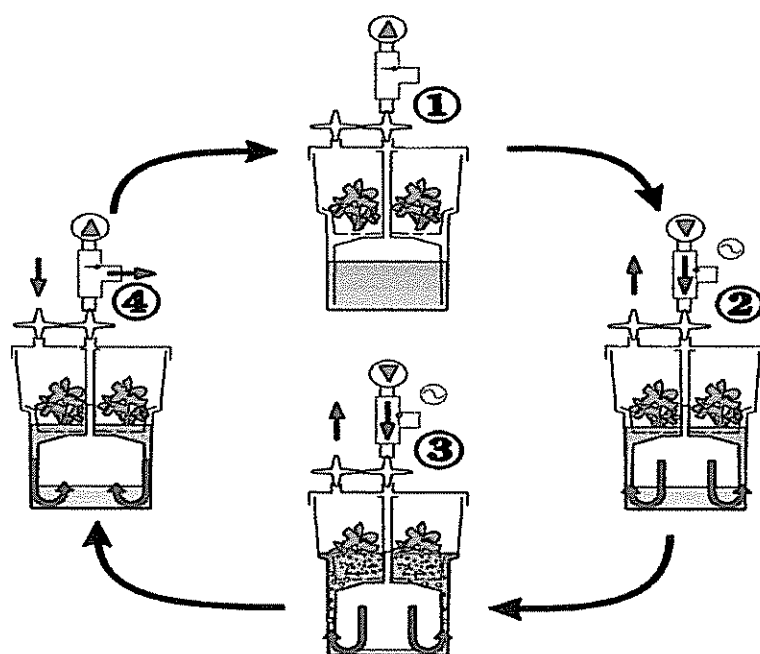


Figura 1. Diagrama que indica el funcionamiento del recipiente para inmersión temporal RITA©. 1 Fase emergida. Los explantes están colocados sobre un disco de esponja de poliuretano. 2 Fase sumergida. Una sobrepresión de aire estéril, aplicada en la parte baja, permite al medio de cultivo subir a la parte alta donde se encuentran los explantes. 4 El aire inyectado permite la oxigenación del medio. 3 El aire de la parte alta se renueva totalmente. 5 Pasado el tiempo de inmersión, la bomba de aire se apaga. Las presiones se equilibran, y el medio vuelve a bajar por gravedad a la parte inferior. Por capilaridad, una fina película de medio se mantiene en contacto sobre los explantes (fuente [cirad.fr/produit/Rita](http://cirad.fr/produit/Rita))



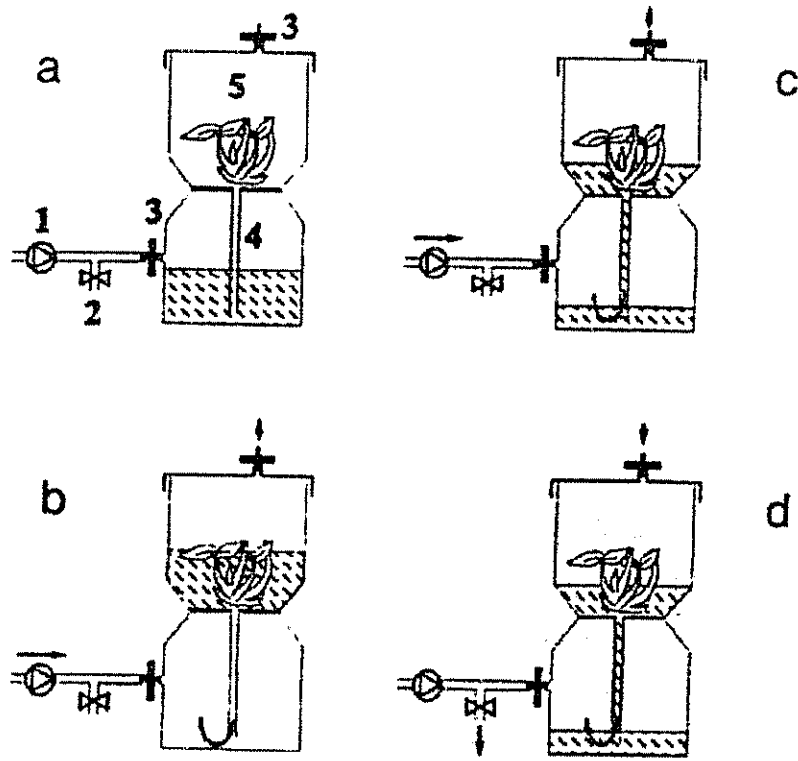


Figura 2. Diagrama que muestra el funcionamiento de la unidad de filtrado Nalgene, Nalge®, modificado para inmersión temporal de células en suspensión. El medio de cultivo sube al compartimento superior (a). Se aplica una fuerza de presión sobre la solución en el compartimento superior del recipiente y los explantes son cubiertos por el medio (b y c). Cuando la presión es liberada, el flujo del medio regresa al compartimento inferior (d). El uso de una válvula solenoide en el circuito acelerado de aire permite el regreso del medio al compartimento inferior. 1- bomba de aire; 2- válvula solenoide, 3- filtro de 22 $\mu$ , 4- tubo conectivo del compartimento inferior con el superior, 5- compartimento superior con laos explantes.

Cuadro 1. Tratamientos aplicados a los cultivares de *Musa* sp

Metodologías	Cultivar	Densidad de inóculo
Medio semi-sólido	Curraré (AAB)	60 embriones
		60 embriones
	Dátil (AA)	60 embriones
		60 embriones
		60 embriones
Medio semi-sólido	Curraré (AAB)	0.5 g
		1.0 g
		1.5 g
	Dátil (AA)	0.5 g
		1.0 g
Medio semi-sólido	Curraré (AAB)	1.5 g
		0.5 g
		1.0 g
	Dátil (AA)	1.5 g
		0.5 g
		1.0 g
		1.5 g

Cuadro 2. Componentes de los diferentes medios de cultivos establecidos por Ma (1991), aplicados a los tres cultivares de *Musa sp.*

Constituyente	Ma2	Ma3	Ma3 (ploteo)	Ma4	Ma5
	(1 L)	(1 L)	(1 L)	(1L)	(1 L)
Macronutrientes (soluc. madre)	50mL	50mL	50mL	50mL	50mL
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650mg/L	-	-	1650mg/L	1650mg/L
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	300mg/L	300mg/L	-	-
KNO <sub>3</sub>	1900mg/L	2500mg/L	2500mg/L	1900mg/L	1900mg/L
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440mg/L	200mg/L	200mg/L	440mg/L	440mg/L
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370mg/L	400mg/L	400mg/L	370mg/L	370mg/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170mg/L	-	-	170mg/L	170mg/L
Micronutrientes (soluc. madre)	5mL	5mL	5mL	5mL	5mL
KI	0.830mg/L	1mg/L	1mg/L	0.830mg/L	0.830mg/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2mg/L	5mg/L	5mg/L	6.2mg/L	6.2mg/L
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	15.1mg/L	-	-	15.1mg/L	15.1mg/L
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	8.6mg/L	10mg/L	10mg/L	8.6mg/L	8.6mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0.250mg/L	0.1mg/L	0.1mg/L	0.250mg/L	0.250mg/L
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025mg/L	0.2mg/L	0.2mg/L	0.025mg/L	0.025mg/L
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025mg/L	0.1mg/L	0.1mg/L	0.025mg/L	0.025mg/L
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	1mg/L	1mg/L	-	-
EDTA-Na-Fe	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.78mg/L	15mg/L	15mg/L	2.78mg/L	2.78mg/L
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	3.73mg/L	20mg/L	20mg/L	3.73mg/L	3.73mg/L
Vitaminas (soluc. madre)	5 mL	5 mL	2 mL	5 mL	5 mL
Tiamina-HCl	0.1 mg/L	0.1 mg/L	0.1 mg/L	1 mg/L	0.1 mg/L
Piridoxina-HCl	0.5 mg/L	0.5 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L	0.5 mg/L
Ac. Nicotínico	0.5 mg/L	0.5 mg/L	0.5 mg/L	1 mg/L	0.5 mg/L
D- pantoténico ácido	-	-	-	1mg/L	-
Azúcares					
Sacarosa	45g/L	45g/L	45g/L	30g/L	30g/L
Lactosa	-	10g/L	10g/L	-	-
Extracto de malta	100mg/L	100mg/L	100mg/L	-	-
Myo-inositol	100mg/L	100mg/L	100mg/L	100mg/L	100mg/L
Proteínas					
Caseína hidrolizada	-	-	-	2 mg/L	-
Sulfato de adenina	-	-	-	-	-
Biotina	1mg/L	1mg/L	1mg/L	0.01mg/L	-
Glutamina	100mg/L	100mg/L	100mg/L	100mg/L	-
Prolina	-	230.2mg/L	230.2mg/L	-	-
Ácido cítrico	-	-	-	100mg/L	-
Ácido ascórbico	-	-	-	100mg/L	-
Glicina	-	-	-	-	-
Reg. de crec.					
2,4-D	1mg/L	-	-	-	-
ANA	-	0.2mg/L	0.2mg/L	-	-
BAP	-	-	-	0.5mg/L	-
IBA	-	-	-	-	-
AIA	-	-	-	2mg/L	-
2iP	-	0.2mg/L	0.2mg/L	2mg/L	-
Kinetina	-	0.1mg/L	0.1mg/L	-	-
Zeatina	-	0.05mg/L	0.05mg/L	-	-
Carbón activado	-	-	-	150mg/L	-
pH	5.3	5.3	5.3	5.8	5.8
Gelrite	-	-	-	4g/L	2.0g/L
Agarosa	-	7g/L	7g/L	7g/L	-

Ma2 Medio Ma para multiplicación  
 Ma3 Medio Ma para regeneración  
 Ma4 Medio Ma para germinación  
 Ma5 Medio Ma para desarrollo

**Anexos 2.** Resultados de los valores de la prueba F para las ANDEVAS y la prueba de DUNCAN realizadas a los datos par las fases de germinación y desarrollo

**Germinación**

Cuadro 1. Valores de la F para la varianza realizada al peso fresco (PF), en gramos, de los recipientes usados (RITA® y Nalgen®) y el testigo en medio semi-sólido, para los cvs. 'Curraré' y 'Dátil', durante la fase de germinación y con un  $\alpha$  de  $\alpha 0.01$ .

Variable	F	Prob
Cultivar	222153.41	<0.0001**
Recipiente	94877.38	0.0001**
Inóculo	11940.61	<0.0001**

- \* diferencia estadísticamente significativa (Prob <0.05)
- \*\* diferencia estadística altamente significativa (Prob 0.01)

Cuadro 2. Valores F de las varianzas realizadas para el número de embriones germinados (EG), embriones no germinados (ENG) y embriones emergidos (EE) de los cvs. 'Dátil' y 'Curraré', según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y los recipientes de inmersión usado (RITA® y Nalgene®), empleando un  $\alpha$  de 0.01. No se tomo en cuenta el testigo.

Variable	Embriones germinados		Embriones no germinados		Embriones emergidos	
	F	Prob	F	Prob	F	Prob
cultivar	5.34	0.0237*	435.91	<.0001**	899.4	<.0001**
recipiente	11.37	0.0012*	6.43	0.0134*	152.2	<.0001**
inóculo	31.88	<.0001**	22	<.0001**	54.66	<.0001**
cultivar * recipiente	112	<.0001**	37.76	<.0001**	166.2	<.0001**
cultivar* inóculo	16.75	0.0108*	6.65	0.0022**	63.29	<.0001**
recipiente * inóculo	4.83	<.0001**	0.9	0.4112	76.9	<.0001**
cultivar * recipiente * inóculo	55.11	<.0001**	5.79	0.0047**	78.97	<.0001**

- \* diferencia estadísticamente significativa (Prob <0.05)
- \*\* diferencia estadística altamente significativa (Prob 0.01)

**Desarrollo**

Cuadro 3. Valores F de las varianzas realizadas para peso fresco (PF) final de la fase de desarrollo de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil', según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y el recipiente de inmersión usado (RITA® y Nalgen®), empleando un  $\alpha$  <0.01. No se tomo en cuenta el testigo.

Variable	F	Probabilidad
Cultivar	19562.86	<.0001**
Metodología	304907.91	<.0001**
Inóculo	16573.4	<.0001**

- \* diferencia estadísticamente significativa (Prob <0.05)
- \*\* diferencia estadística altamente significativa (Prob 0.01)

Cuadro 4. Valores F de las varianzas realizadas para el número de embriones germinados, embriones no germinados y embriones emergidos de el cv. 'Curraré' durante la fase de desarrollo, según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 g) y el recipiente de inmersión usado (RITA® y Nalgen® ), empleando un  $\alpha$  de 0.01. No se tomo en cuenta el testigo.

Variable	Embriones germinados		Embriones no germinados		Embriones Emergidos		Plántulas	
	F	Prob	F	Prob	F	Prob	F	Prob
Recipiente	50.31	<0001**	28.56	<0001**	4.61	0.0443	62.6	<0001**
Inóculo	8.09	0.0027**	29.5	<0001**	14.1	0.0002**	29.06	<0001**
Estrato	1.07	0.3623	1.04	0.3715	0.11	0.8951	5.02	0.0172
Recipiente*inóculo	7.27	0.0042**	29.2	<0001**	6.59	0.0063**	26.25	<0001**
Recipiente* Estrato	1.29	0.2982	0.84	0.4448	2.55	0.103	2.24	0.132
Inóculo*Estrato	.58	0.6818	0.89	0.4854	0.99	0.4362	1.46	0.2523
Recipiente*inóculo*estrato	1.04	0.4122	0.97	.04477	0.81	0.5359	3.93	0.0156

- \* diferencia estadísticamente significativa (Prob <0.05)
- \*\* diferencia estadística altamente significativa (Prob 0.01)

Cuadro 5. Valores F de las varianzas realizadas para el número de embriones germinados, embriones no germinados, embriones emergidos y plántulas del cv. 'Dátil' durante la fase de desarrollo, según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 gr) y el recipiente de inmersión usado (Nalgen® y RITA®), empleando un  $\alpha$  <0.05. No se tomo en cuenta el testigo.

Variable	Embriones germinados		Embriones no germinados		Embriones Emergidos		Plántulas	
	F	Prob	F	Prob	F	Prob	F	Prob
Recipiente	12.87	0.0049**	395.8	<0001**	2.92	0.118	0.08	0.789
Inóculo	35.65	<0001**	290.7	<0001**	3.29	0.08	97.82	<0001*
Estrato	17.02	0.0006**	30.92	<0001**	0.37	0.7003	1.32	0.0311*
Recipiente*inóculo	12.32	0.0056**	336.8	<0001**	6.86	0.0256	2.59	0.139
Recipiente* Estrato	18.2	0.0005**	78.71	<0001**	0.37	0.7003	0.41	0.6713
Inóculo*Estrato	83.2	0.0032	37.84	<0001**	1.23	0.3336	1.91	0.1849
Recipiente*inóculo*estrato	11	0.003	87.6	<0001**	1.84	0.1987	0.1	0.9095

- \* diferencia estadísticamente significativa (Prob <0.05)
- \*\* diferencia estadística altamente significativa (Prob 0.01)

Cuadro 6. Valores F de las varianzas realizadas del número de hojas por plántula de los cvs. 'Curraré' y 'Dátil' durante la fase de desarrollo, según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 gr) y el recipiente de inmersión usado (RITA® y Nalgen® de Nalgene), empleando un  $\alpha$  0.01. No se tomo en cuenta el testigo.

Variable	F	Probabilidad
Cultivar	4.79	0.0400*
Recipiente	13.26	0.0015**
Inóculo	19.25	<0001**
Cultivar*Recipiente	10.02	0.0047**
Cultivar*Inóculo	4.11	0.0313*
Recipiente*Inóculo	2.68	0.0921
Cultivar*Recipiente*Inóculo	2.51	0.1051

- \* diferencia estadísticamente significativa (Prob <0.05)
- \*\* diferencia estadística altamente significativa (Prob 0.01)

Cuadro 7. Valores F de las varianzas de la presencia o ausencia de raíces en las plántulas de los cultivares 'Curraré' y 'Dátil' durante la fase de desarrollo, según el inóculo (0.5, 1.0 y 1.5 gr) y el recipiente de inmersión usado (RITA® y Nalgen® de Nalgene), empleando un  $\alpha < 0.01$ . No se tomo en cuenta el testigo.

Variable	F	Probabilidad
Cultivar	11.86	0.0024**
Recipiente	0.75	0.3951
Inóculo	11.92	0.0003**
Cultivar*Recipiente	0.06	0.8063
Cultivar*Inóculo	5.4	0.0128*
Recipiente*Inóculo	0.60	0.5567
Cultivar*Recipiente*Inóculo	1.22	0.3152

- \* diferencia estadísticamente significativa (Prob <0.05)
- \*\* diferencia estadística altamente significativa (Prob 0.01)

### ACLIMATACIÓN

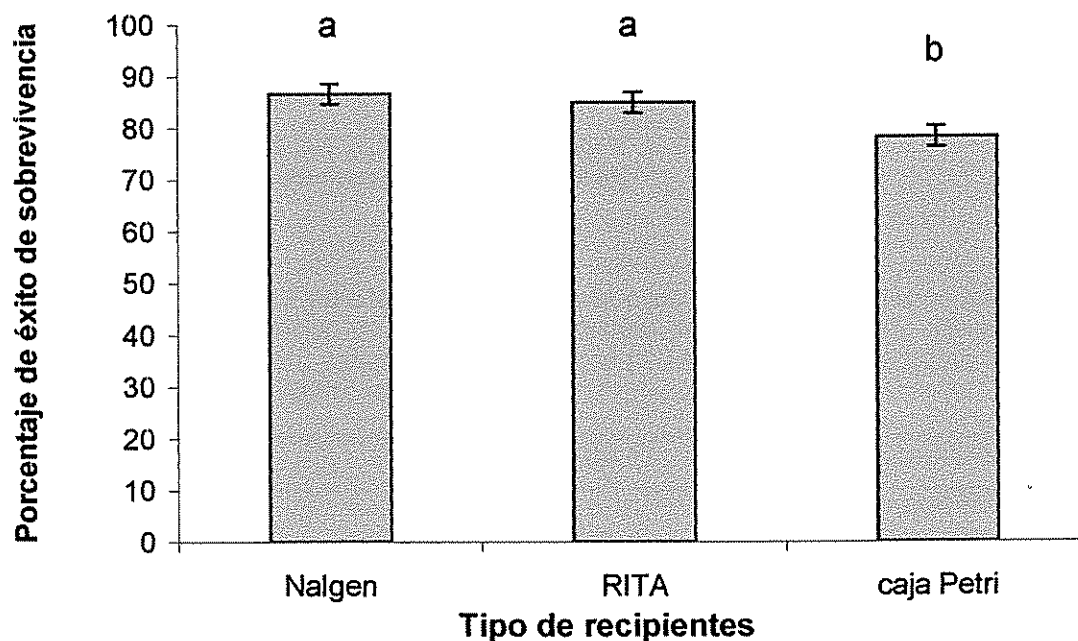


Figura 1. Significancia de los porcentajes de sobrevivencia para las plántulas del cv 'Curraré' cultivadas en los recipientes de inmersión temporal Nalgen® y RITA® y el testigo en medio de cultivo semi-sólido con una densidad de siembra de 0.5 gr., aclimatadas por un mes. Las barras indican la desviación estándar y las letras indican las diferencias significativas para la prueba Duncan. Se usó un  $\alpha$  de 0.01.

Cuadro 8. Significancia de los promedios de la longitud (cm) y del número de hojas de las plántulas del cv. 'Curraré' derivadas del inóculo de 0,5g, en los recipientes de inmersión temporal (Nalgen® y RITA©) y el testigo en medio de cultivo semi-sólido. Se usó la prueba de Duncan con un  $\alpha$  0.01.

Recipiente	Longitud (cm)	Número de hojas
Nalgen®	aa	aa
	aa	aa
RITA©	aa	aa
	aa	aa
semi-sólido	b	b
	b	b
semi-sólido	b	b
	b	b

Cuadro 9. Valores de la F para la varianza realizada al incremento del número de hojas presentes en las plántulas del cv 'Curraré' de los recipientes usados (RITA© y Nalgene®) y el testigo en medio semi-sólido, durante la fase de germinación y con un  $\alpha$  de <0.01.

Variable	F	Probabilidad
Recipiente	403.51	<.0001**
Día	337.84	<.0001**
Recipiente*día	0.2	0.9867

- \* diferencia estadísticamente significativa (Prob <0.05)
- \*\* diferencia estadística altamente significativa (Prob 0.01)

Cuadro 10. Valores de la F para la varianza realizada a los estomas presentes en las plántulas del cv 'Curraré' según la posición de la hoja (haz y envés) para dos momentos diferentes (antes y después de la aclimatación) y usando los recipientes (RITA© y Nalgen® de Nalgene) y el testigo en medio semi-sólido. Se utilizó un  $\alpha$  de <0.01.

Variable	Valor de F	Probabilidad
Recipiente	33.8	<.0001**
Momento	16.16	0.0024**
Posición	242.46	<.0001**
Recipiente*inóculo	11.51	0.0094**
Recipiente*posición	16.19	0.0025**
Momento*Posición	86.1	0.0024**
Recipiente*momento*posición	4.54	0.0395*

- \* diferencia estadísticamente significativa (Prob <0.05)
- \*\* diferencia estadística altamente significativa (Prob 0.01)