

EFFECTO DEL SULPOMAG Y COMPLEJOS ORGÁNICOS COMO SUSTITUTOS PARCIALES DEL MEDIO DE CULTIVO DE MICROPROPAGACIÓN DE *Musa* sp. CV. CAVENDISH

Frank E. Montenegro-Juárez*, Consuelo Rojas-Idrogo*, David Quevedo-Calle**, Guillermo E. Delgado-Paredes^{1/*}

Palabras clave: Micropropagación, cultivo in vitro, *Musa* sp., cv. Cavendish, Sulpomag.

Keywords: Micropropagation, in vitro culture, *Musa* sp., cv. Cavendish, Sulpomag.

Recibido: 21/01/13

Aceptado: 02/09/13

RESUMEN

El fertilizante de origen natural Sulpomag, o sulfato de potasio y magnesio, constituido por K₂O 22%, MgO 22%, S 18% y Cl (cloruro) 2,5% y los complejos orgánicos agua de coco 10 y 20% y caseína hidrolizada 250 y 500 mg.l⁻¹, como sustitutos parciales de las sales minerales de Murashige y Skoog (MS), fueron utilizados en la propagación in vitro de banano, *Musa* sp., cv. Cavendish. El objetivo de esta investigación fue inducir el crecimiento y desarrollo de plantas in vitro en condiciones mínimas de sales minerales inorgánicas, prohibidas en el reglamento técnico para los productos orgánicos. Ápices caulinares, cultivados en medio de cultivo MS, fueron transferidos a 10 formulaciones de multiplicación de brotes suplementadas con KH₂PO₄ (170 mg.l⁻¹), CaCl₂·2H₂O (150 mg.l⁻¹), NH₄NO₃ y KNO₃, a 1/5 y 1/10 de la concentración MS, micronutrientes MS y Sulpomag 0,1096 g.l⁻¹, AIA 0,2 mg.l⁻¹ y BAP 5 mg.l⁻¹. El medio de cultivo de enraizamiento fue de igual formulación de sales minerales, con variaciones en los reguladores de crecimiento. Los mejores resultados se obtuvieron con NH₄NO₃ y KNO₃ a 1/5 de la concentración MS, Sulpomag 0,1096 g.l⁻¹ y agua de coco

ABSTRACT

Effect of sulpomag and organic complexes as partial substitutes of the culture medium used in the micropropagation of *Musa* sp. Cv. Cavendish. The Sulpomag natural fertilizer, or potassium sulfate and magnesium, constituted by K₂O 22%, MgO 22%, S 18% and Cl (chloride) 2.5% plus organic complexes of coconut water 10 to 20%, and casein hydrolyzate 250 and 500 mg.l⁻¹, as partial substitutes for mineral salts of Murashige and Skoog (MS), were used in the in vitro propagation of banana, *Musa* sp., cv. Cavendish. The aim was that the in vitro plants grow and develop in minimum quantities of mineral salts, banned in the technical regulation for organic products. Shoot tips, established in vitro on MS medium, were transferred to 10 treatments for shoot multiplication supplemented with KH₂PO₄ (170 mg.l⁻¹), CaCl₂·2H₂O (150 mg.l⁻¹), NH₄NO₃ and KNO₃, at 1/5 and 1/10 of the MS concentration, MS micronutrients and 0.1096 g.l⁻¹ of Sulpomag, IAA (0.2 mg.l⁻¹) and BAP (5 mg.l⁻¹). The rooting medium was the same formulation of mineral salts, only varying on the growth regulators. Best results were obtained in culture media supplemented with NH₄NO₃ and KNO₃ at

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: webmaster@unprg.edu.pe

* Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Ciudad Universitaria, Juan XXIII 391, Lambayeque, Perú.

** Asociación Chira-Centro de Formación Binacional, Mallares, Sullana, Piura, Perú.

10 y 20%. Los resultados obtenidos posibilitan la utilización del Sulpomag y el agua de coco como sustitutos parciales de las sales minerales MS en la propagación in vitro de *Musa* sp., cv. Cavendish en la agricultura orgánica.

1/5 of MS concentration, 0.1096 g.l⁻¹ Sulpomag and coconut water 10 y 20%. The results allow to consider the possibility of using Sulpomag and coconut water, as partial substitutes for MS mineral salts for in vitro propagation of *Musa* sp., cv. Cavendish for use in organic agriculture.

INTRODUCCIÓN

El banano y plátano (*Musa* spp.), pertenecen a la familia Musaceae, una de las mejor caracterizadas entre las monocotiledóneas. Genéticamente, las variedades comerciales se derivaron de las especies silvestres *Musa acuminata* de genoma AA y *M. balbisiana* de genoma BB, ambas especies con cromosomas 2n=22. De éstas se reconocieron como hibridaciones naturales a través del tiempo las variedades diploides AB, las triploides AAA, AAB, ABB y las tetraploides AAAA, AAAB, AABB y AB BB (Simmonds y Shepherd 1956), aunque Pillay et ál. (2004) informaron que deben considerarse otros genomas como 'S' y 'T'. Desde el punto de vista comercial, el grupo triploide AAA, constituido por clones estériles y partenocárpicos, es el más importante. Entre éstos destaca el cv. Cavendish, ampliamente cultivado con prácticas orgánicas en el norte del Perú debido a su resistencia a la Sigatoka negra (*Micosphaerella fijiensis*), constituyéndose en una alternativa de progreso y bienestar económico para los pequeños y medianos agricultores de la región.

En efecto, la agricultura orgánica en el mundo crece a una tasa promedio de 15%, en una búsqueda permanente de alimentos sanos, libres de pesticidas, aunada a la preocupación de un amplio sector de la población mundial por los cultivos transgénicos y el daño creciente al medio ambiente. En el 2006 se estimó una superficie agrícola de 31 millones de hectáreas

destinadas a la agricultura orgánica donde destaca Australia con 42% del total, seguido de Europa (21%), América Latina (20%), Asia (13%) y África (3%). En América Latina Perú es uno de los países con mayor desarrollo de la agricultura orgánica y sobresale en el 2007, el cultivo de café (76%), banano (15%) y cacao (2%), exportado a los EE. UU (AGRODATA 2008); sin embargo, para la obtención de la certificación orgánica de exportación se requiere cumplir rigurosas normas técnicas que garanticen que el producto se encuentra libre de compuestos químicos considerados prohibidos como la urea y relacionados que contengan nitrato de potasio (KNO₃) y nitrato de amonio (NH₄NO₃), entre otros.

Las técnicas del cultivo de tejidos, en especial las relacionadas con el saneamiento de enfermedades sistémicas y la propagación masiva y rápida, se han convertido en herramientas indispensables en el desarrollo de la agricultura. Vasil (2008) considera que este desarrollo se debe en gran medida a la formulación, a partir de la década del 50, de medios de cultivo con altos contenidos de sales minerales, particularmente de amonio, nitrato, fosfato y potasio como las sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962) y B5 (Gamborg et ál. 1968), entre otras. Estas sales minerales, formuladas inicialmente para la inducción y crecimiento de callos de *Nicotiana tabacum* y suspensiones celulares de *Glycine max*, respectivamente, se utilizaron en una amplia variedad de especies, incluso muy distantes taxonómicamente. Actualmente el medio de cultivo

MS es el más utilizado en cultivo de tejidos de numerosas especies y si bien no siempre se ha observado crecimiento óptimo de los explantes, por lo menos ha ocurrido un crecimiento inicial (Niedz y Evens 2007, George y de Klerk 2008, Azofeifa et ál. 2008).

Por otro lado, la literatura reporta la búsqueda permanente de sustitutos de los componentes del medio de cultivo con la finalidad de disminuir los costos, que en el caso de los países en desarrollo, junto a otros rubros como la mano de obra y la energía eléctrica, representan 30–35% del costo de producción (IAEA 2004). Así tenemos que en la propagación de banano se ha intentado sustituir completamente las sales minerales MS por soluciones nutritivas pobres en elementos minerales como las sales de Knop; sin embargo, los resultados fueron poco satisfactorios (Ganapathi et ál. 1995). En otros casos se utilizó el fertilizante foliar 7-6-19 en el enraizamiento de meristemas de *Cattleya* sp. (Gutiérrez 1996), el fertilizante 20-10-20 en el cultivo de semillas de *Arabidopsis thaliana* (Pollock y Oppenheimer 1999), los fertilizantes Peters (24-8-16), Floren (10-15-5) y Folifétil (20-30-10) en la micropropagación de *Laelia anceps* (Romero-Tirado et ál. 2007) y varios abonos foliares comerciales en la micropropagación de nudos de *Solanum tuberosum* (Azofeifa et ál. 2008).

Los primeros trabajos sobre micropropagación de banano se realizaron con ápices caulinares (Ma y Shii 1972). Desde entonces numerosas variedades y clones de banano y plátano se propagaron en varias partes del mundo (Krikorian y Croanuer 1984, Sandoval et ál. 1991) hasta alcanzar tasas muy altas de propagación mediante el Sistema de Inmersión Temporal (Alvard et ál. 1993, Colmenares y Giménez 2003). Adicionalmente, cabe destacarse los trabajos pioneros de Berg y Bustamante (1974) quienes utilizaron el cultivo de meristemas para obtener plantas del cv. Cavendish saneadas del virus del mosaico del pepino (CMV) y el de Banerjee y de Langhe (1985) quienes desarrollaron un protocolo para conservar in vitro germoplasma de bananos y plátanos por limitación del crecimiento a tasas

mínimas y la transformación genética mediante biobalística (Valerio y de García 2008). No obstante, las técnicas del cultivo de tejidos no son reconocidas como aplicables para la agricultura orgánica, las que se fundamentan en la incorporación de sales minerales no permitidas (Reglamento Técnico para los Productos Orgánicos 2006), que limitaban la obtención de unidades de siembra sanas y consecuentemente la posibilidad de utilizar la biotecnología para incrementar los niveles de producción. Es por ello que el objetivo de esta investigación fue desarrollar un medio de cultivo que sustituya parcialmente las sales minerales del medio de cultivo MS por el Sulpomag, fertilizante inorgánico autorizado, así como por los complejos orgánicos agua de coco (AC) y caseína hidrolizada (CH), fuentes de nitrógeno orgánico, en la propagación in vitro del banano *Musa* sp., cv. Cavendish, en el norte del Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como material vegetal se utilizaron hijuelos de espada de banano, *Musa* sp., var. Cavendish, de 20–40 cm de altura, obtenidos de plantas en producción en las mejores condiciones fisiológicas y fitosanitarias, en los campos agrícolas de la Asociación Chira, Sullana, Piura (Perú). Estas plantas se encontraban con fertilización orgánica.

Desinfestación y establecimiento del cultivo

Los hijuelos se lavaron con abundante agua con detergente para eliminar la tierra de cultivo. Luego se deshojaron con un cuchillo de cocina hasta obtener un ápice caulinar de 3 cm de altura. A razón de un explante por frasco se desinfectaron con alcohol etílico 70% durante 1 min e hipoclorito de sodio concentrado (Clorox® 5,25% de cloro activo) con 3 gotas de Tween 20 durante 10 min, enjuagaron con agua destilada esterilizada por 3 veces consecutivas e inocularon en el medio de cultivo de iniciación. Este medio de cultivo incluyó las sales minerales MS (Murashige y Skoog 1962), las vitaminas

m-inositol 100 mg.l⁻¹ y tiamina.HCl 1 mg.l⁻¹, sacarosa 2%, BAP (benzilaminopurina) 5 mg.l⁻¹ y agar 0,6%. El pH del medio de cultivo se ajustó en 5,8±0,1 con HCl y NaOH 0,1N, antes de dispensarlo en frascos de vidrio de 10x6 cm, y después de sellados, se esterilizaron en 121°C de temperatura y 15 libras/pulgada² de presión durante 20 min. Las condiciones ambientales de incubación se ajustaron a 24–26°C, 80–85% de humedad relativa, 30 μmol.m⁻².s⁻¹ de intensidad lumínica y 16/8 h de fotoperiodo.

En el control de la contaminación bacteriana endógena se utilizó una solución de cloranfenicol y rifampicina, 50 y 30 mg.ml⁻¹, respectivamente, eluidas en agua destilada esterilizada, mientras que los explantes contaminados se colocaron en frascos esterilizados con 10 ml de la solución bactericida durante 48 h.

Características e incorporación del Sulpomag

El Sulpomag o sulfato de potasio y magnesio, es un fertilizante de origen natural con la siguiente composición química: K₂O 22%, MgO 22%, S 18% y Cl (cloruro) 2,5% y humedad máxima 0,5%. Sus propiedades físico-químicas se detallan en el Cuadro 1.

En la incorporación del Sulpomag se adoptó el siguiente criterio y procedimiento: Las sales minerales MS incorporan MgSO₄.7H₂O 370 mg.l⁻¹ (0,37 g.l⁻¹) y a partir del peso molecular (PM) del compuesto (150 g) y el peso atómico del Mg (24 g), se estableció una relación de 100 g de Sulpomag en 22 g (22%), tal como lo indicó la composición del fertilizante, por lo tanto, la relación estableció 0,2690 g de Sulpomag. El mismo criterio se utilizó para el caso del azufre (MgSO₄.7H₂O 150 g y S 32 g), cuya relación estableció 0,4385 g de Sulpomag y en el caso de la incorporación del potasio (K) se tomó en consideración que en las sales minerales MS éste elemento se incorpora como KNO₃ 1900 mg.l⁻¹ (1,9 g.l⁻¹) y KH₂PO₄ 170 mg.l⁻¹ (0,17 g.l⁻¹) y con el razonamiento anterior, la sumatoria de la relación estableció 3,5564 g de Sulpomag. En función a estos resultados se consideró la cuarta parte del valor obtenido para el S, es decir, 0,1096 g a incorporar por litro de medio de cultivo, para de esta manera no incurrir en deficiencia de Mg o en exceso de K, que resultaría tóxico. Los valores obtenidos y las relaciones establecidas se detallan en el Cuadro 2.

Cuadro 1. Propiedades físico-químicas del sulfato de potasio y magnesio (Sulpomag), utilizado en el brotamiento de ápices caulinares y enraizamiento de brotes de banano (*Musa* sp., var. Cavendish).

Propiedades físico-químicas del Sulpomag ¹	
Estado físico: Sólido	Solubilidad: 244 g.l ⁻¹ (25°C)
Apariencia: Cristales o granulado	Punto de ebullición: No disponible
Color: Rosado	Punto de inflamación: No disponible
Olor: Característico	Punto de fusión: 1066-7°C
Densidad: 2,8 g/cm ³ 1442–1506 kg/m ³ (de almacenamiento)	Temperatura de auto ignición: No disponible
pH: 7,0 (5% de solución) a 20°C	Temperatura de descomposición: No disponible
Peso molecular: 415 g.mol ⁻¹	

¹ Fuente: MISTI Fertilizantes S.A.

Cuadro 2. Relación entre los componentes (K, S y Mg) del Sulpomag, respecto a sus correspondientes en el medio de cultivo MS, utilizados en el brotamiento de ápices caulinares y enraizamiento de brotes de banano (*Musa* sp., var. Cavendish).

Composición del Sulpomag (%)	Peso para cada componente (g)	Elemento	Sulpomag (g)	MS (g)	Relación
Respecto a K (3,5556 g)					
K 22,0	0,7824				
Mg 22,0	0,7824	Mg	0,7824	0,0592	1:13,21
S 18,0	0,6401	S	0,6401	0,0789	1:8,11
Respecto a S (0,4385 g)					
K 22,0	0,0966	K	0,0966	0,7824	1:0,12
Mg 22,0	0,0966	Mg	0,0966	0,0592	1:1,63
S 18,0	0,0789				
Respecto a Mg (0,2690 g)					
K 22,0	0,0592	K	0,0592	0,7824	1:0,07
Mg 22,0	0,0592				
S 18,0	0,0482	S	0,0482	0,0789	1:0,61

Inducción de brotes y enraizamiento de plántulas

Después de 30 días de cultivo, en el medio de cultivo de iniciación, los explantes se seccionaron longitudinalmente en 2 partes iguales y cultivaron en los diferentes tratamientos de medio de cultivo de inducción de brotes. Posteriormente, después de 60 días de cultivo, los brotes formados se cultivaron en los diferentes tratamientos de medio de cultivo de enraizamiento.

En la fase de inducción de brotes el tratamiento testigo (To) incorporó las sales minerales MS (macro y micronutrientes), las vitaminas m-inositol 100 mg.l⁻¹ y tiamina.HCl 1 mg.l⁻¹, sacarosa 4%, AIA (ácido indol-3-acético) 0,2 mg.l⁻¹, BAP 5 mg.l⁻¹ y agar 0,6%. Los tratamientos ensayados (T1 – T10) incorporaron KH₂PO₄ 170 mg.l⁻¹ del medio de cultivo MS, CaCl₂.2H₂O 150 mg.l⁻¹ del medio de cultivo B5 (Gamborg et ál. 1968), los micronutrientes del medio de cultivo MS, Sulpomag 0,1096 g.l⁻¹, sacarosa 4%, AIA 0,2 mg.l⁻¹, BAP 5 mg.l⁻¹ y

agar 0,6%; los tratamientos T1–T5 incorporaron NH₄NO₃ y KNO₃ (330 y 380 mg.l⁻¹) y T6–T10 (165 y 190 mg.l⁻¹) que correspondieron a 1/5 y 1/10 del medio de cultivo MS, respectivamente; los suplementos orgánicos caseína hidrolizada (CH) 250 y 500 mg.l⁻¹ y agua de coco (AC) 10 y 20%, se incorporaron de acuerdo con los tratamientos formulados.

En la fase de enraizamiento los tratamientos tuvieron una formulación similar a lo establecido para el medio de cultivo de inducción de brotes con la excepción que en el testigo (To) las sales minerales MS fueron incorporadas a la mitad de su concentración, vitaminas, sacarosa 3%, AIB (ácido indolbutírico) 0,2 mg.l⁻¹, carbón activado (CA) 0,25% y agar 0,6%. Los tratamientos ensayados (T1–T10) incorporaron todo lo indicado en los tratamientos de medio de cultivo de inducción de brotes con la excepción de que los reguladores de crecimiento AIA y BAP fueron sustituidos por AIB 0,2 mg.l⁻¹ y sacarosa 3%, suplementándose, además, CA 0,25%.

En ambos medios de cultivo el pH se ajustó en $5,8 \pm 0,1$ con HCl y NaOH 0,1N, antes de dispensarlos en frascos de vidrio de 10×6 cm, y después de sellados se esterilizaron en las mismas condiciones que para el caso del medio de cultivo de establecimiento o iniciación. Las condiciones ambientales de incubación se ajustaron a $24-26^\circ\text{C}$, 80–85% de humedad relativa, $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica y 16/8 h de fotoperiodo.

Transferencia a suelo y aclimatación

Plántulas de 3–5 cm de altura fueron sembradas en sustrato esterilizado con calor seco, integrado por una mezcla en proporciones iguales de tierra de cultivo, tierra vegetal, compost y limo (1:1:1:1); luego se colocaron en cámara de plástico para proporcionarles un ambiente artificial de alta humedad. Los riegos se realizaron diariamente con agua corriente y después de un mes las plantas se transfirieron a bolsas de polietileno con sustrato tierra de cultivo y arena de río (2:1), antes de sembrarlas en campo definitivo.

Variables evaluadas y análisis estadístico

Después de 60 días de cultivo se evaluó el número de brotes formados, altura del brote, tasa de crecimiento, número de raíces por plántula, longitud de raíces, peso seco y número de plántulas normales (plántulas sin síntomas visuales de deficiencia nutricional, clorosis, necrosis apical o albinismo). Cada tratamiento contó con 12 repeticiones y el experimento se repitió 2 veces. En el análisis estadístico se aplicó la prueba paramétrica “post hoc” de múltiples rangos de Duncan para ANOVA de un factor para determinar grupos homogéneos a un nivel de significación del 5% ($p \geq 0,05$); éstos parámetros fueron obtenidos con el software estadístico SPSS Statistics 19 (IBM Corp. Released 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Establecimiento del cultivo

El mayor problema en el establecimiento del cultivo in vitro de banano fue la contaminación bacteriana provocada por gérmenes Gram positivos del género *Bacillus*, contaminación de aspecto cremoso y lechoso, ligeramente mucoides, formada alrededor del explante. Carranza et ál. (2006), al estudiar la propagación in vitro de banano del cv. FHIA-18, informan sobre la presencia de *B. subtilis*, causante de la alta tasa de contaminación observada, en donde la bacteria cubría totalmente la superficie del explante que provocaba necrosis y muerte del tejido.

Según el sitio de colecta del material vegetal, la contaminación bacteriana por *Bacillus* sp., con presencia de endosporas, llegó a 100%, en especial en explantes provenientes de plantas de sitios inundados o con escaso drenaje; sin embargo, la contaminación se controló parcialmente (50–70%) con aplicación de una solución de cloranfenicol y rifampicina, 50 y 30 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, respectivamente, eluidas en agua destilada durante 48 h. Algunos autores consideran que las especies de este género son contaminantes introducidos como resultado de prácticas deficientes de laboratorio (Leifert y Waites 1993, Carranza et ál. 2006); sin embargo, para la mayoría la principal fuente de contaminación es el tipo y origen del explante (Van de Houwe 1998, Moutia y Dookun 1999, Thomas 2004).

Inducción y elongación de brotes

En el Cuadro 3 se observó, en la evaluación realizada en 60 días de cultivo, que en el tratamiento T5 se alcanzó el mayor número de brotes formados (5,4), muy similar a lo obtenido en el testigo (To) (5,1), mientras que en el tratamiento T7 se observó el menor número de brotes formados (2,5). En los tratamientos T6 y T7, los escasos brotes formados no fueron considerados en la fase posterior de enraizamiento debido a su precaria condición fisiológica. La prueba de significación de Duncan mostró que si bien el

Cuadro 3. Efecto del fertilizante Sulpomag y las fuentes nitrogenadas caseína hidrolizada (CH) y agua de coco (AC) en la inducción de brotes de banano (*Musa* sp., var. Cavendish), después de 60 días de evaluación.

Tratamiento	Concentración (KNO ₃ + NH ₄ NO ₃) MS	Sustancias complejas ¹		Respuesta ²		
		CH (mg.l ⁻¹)	AC (%)	Brotes (Nº)	Altura de planta (cm)	Plantas Normales (%)
To (Testigo)	MS	-	-	5,1 cd	1,8 e	100,0
T1	1/5	-	-	3,8 bc	1,5 cd	68,0
T2	1/5	250	-	3,8 bc	1,4 cd	68,0
T3	1/5	500	-	4,8 cd	1,4 bcd	100,0
T4	1/5	-	10	4,7 cd	1,4 bcd	75,0
T5	1/5	-	20	5,4 d	1,6 de	100,0
T6	1/10	-	-	3,3 ab	1,0 a	15,0
T7	1/10	250	-	2,5 a	1,1 ab	15,0
T8	1/10	500	-	3,1 ab	1,5 cd	35,0
T9	1/10	-	10	4,1 bc	1,2 abc	35,0
T10	1/10	-	20	4,3 bcd	1,2 abc	35,0
				C.V=33,7%	C.V=23,7%	

¹ CH, caseína hidrolizada; AC, agua de coco.

² Valores con letras distintas indican diferencias significativamente por la prueba de Duncan $p \leq 0,05$.

tratamiento T5 fue superior, resultó estadísticamente igual a los tratamientos To, T3 y T4.

En un estudio realizado con 4 cultivares de banano, al utilizar sales minerales MS suplementadas con BAP 3–5 mg.l⁻¹, después de 45 días de cultivo, en Curraré (AAB), Dominico (AAB), Gran Enano (AAA) Valery (AAA), se formaron 2,0–4,5 brotes.planta⁻¹ (Sandoval et ál. 1991). En el cv. Hartón (AAB) se alcanzó un índice de multiplicación de brotes de 4,3 en medio de cultivo con BAP 5 mg.l⁻¹ (Colmenares y Giménez 2003); sin embargo, en las mismas condiciones de cultivo en bananos del grupo Cavendish (AAA) se alcanzó 4,9 brotes (Hardy y de García 1994), que discrepaba con lo informado para el cv. Williams (AAA) en el que se obtuvo apenas 2,4 brotes (Colmenares y Giménez 2003). En otras formulaciones de medio de cultivo con BAP 5 mg.l⁻¹ y AIA 1,2 mg.l⁻¹, en el plátano cv. Maqueño (AAB) se alcanzó 2,5 brotes (Canchignia et ál. 2007) y

en banano del cv. Grand Nain (AAA), en medio de cultivo con BAP 2,5 mg.l⁻¹ se obtuvo 2,1 brotes (Alvard et ál. 1993). Si se comparan estos resultados con los obtenidos en la investigación que se presenta, se observa que fueron ligeramente similares, en unos casos, y en otros ampliamente inferiores, puesto que en esta investigación, tanto en el tratamiento T5 como en el testigo (To), se formaron 5,4 y 5,1 brotes, respectivamente. Es posible que la mayor formación de brotes observado en el tratamiento T5 se deba al suplemento de AC 20% en medio de cultivo MS 1/5 (de la concentración total de NH₄NO₃ + KNO₃). Al respecto, Colmenares y Giménez (2003) observaron que en el cv. Williams (AAA), en medio de cultivo con BA 1,5 mg.l⁻¹ y AC 20%, se formaron 2,4 brotes, muy similar a lo observado en medio de cultivo con BA 2,5 mg.l⁻¹, sin AC, donde se formaron 2,7 brotes.

Como es conocido, el AC es una sustancia muy compleja que posee una amplia variedad de componentes orgánicos e inorgánicos, entre los cuales citamos aminoácidos esenciales, diversos compuestos nitrogenados, hormonas, enzimas, purinas y pirimidinas, así como sales minerales y alto contenido de fósforo y magnesio (Krikorian 1991). Los resultados obtenidos en la investigación que se presenta, con aplicación de AC, fueron similares a los obtenidos sobre morfogénesis en explantes juveniles y adultos de varias plantas leñosas como *Kalopanax septemlobus* (Moon et ál. 2008), *Cedrela odorata* (Peña-Ramírez et ál. 2010), entre otras, lo que se atribuye a la presencia de una mezcla compleja de varias citocininas, entre otras sustancias presentes en el AC, que resultaría químicamente irreproducible (Ge et ál. 2005, 2006). En cuanto al efecto de la CH, en el tratamiento T3, que incorporó MS 1/5 (de la concentración total de $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$) y CH 500 mg.l^{-1} se observó 4,8 brotes formados, un valor estadísticamente igual al obtenido en el tratamiento T5. Una tendencia similar se observó en *Musa* del grupo AA donde un mayor número de brotes se formaron en medio de cultivo suplementado con CH 100 mg.l^{-1} , respecto al medio de cultivo carente de este complejo orgánico (Strangsam y Kanchanapoom 2007).

En altura de brotes, en el testigo (To) se alcanzó la mayor altura (1,8 cm), ligeramente superior a lo obtenido en los tratamientos T5 y T8 (1,6 y 1,5 cm, respectivamente); en el tratamiento T6 se observó la menor altura de brotes (1,0 cm), al igual que en el tratamiento T7, por lo que no fueron considerados en la fase posterior de enraizamiento. La prueba de significación de Duncan mostró que si bien el testigo (To) fue superior, resultó estadísticamente igual al tratamiento T5. La altura de plántula observada en los cultivares Curraré, Dominico, Gran Enano y Valery, en 45 días de cultivo, fue entre 9,1–11,7 cm (Sandoval et ál. 1991), cifras relativamente próximas a las informadas para el banano cv. Basrai con 7,0 cm de altura de plántula (Ganapathi et ál. 1995); sin embargo, en otros trabajos se informó una altura de plántula de 3,3 cm en el cv. Maqueño (AAB) (Canchignia et ál.

2007) y 2,8 cm en el cv. Barraganete (Canchignia y Ramos 2004). En todo caso, los valores alcanzados en la investigación que se presenta resultaron inferiores puesto que en el mejor tratamiento (T5) se alcanzó una altura de planta de 1,6 cm. Es posible que los datos obtenidos por Sandoval et ál. (1991) obedezcan al método utilizado para medir la altura de la plántula; sin embargo, el pobre crecimiento de los brotes en la investigación que se presenta puede deberse a la concentración muy baja de las sales minerales MS 1/5 y 1/10 (de la concentración total de $\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{KNO}_3$) lo que no fue revertido ni por el suplemento del Sulpomag ni por los aditivos orgánicos complejos (AC y CH); este hecho resultó dramático para los tratamientos T6 y T7 donde las plántulas formadas mostraron una precaria condición fisiológica por lo que fueron descartadas en la continuidad de los ensayos. En otros trabajos, Pollock y Oppenheimer (1999) no encontraron diferencias en el crecimiento de plantas de *Arabidopsis* al cultivarlas en medio de cultivo suplementado con el fertilizante comercial 20-10-20, comparado con lo observado en el medio de cultivo MS y un caso similar también fue reportado por Azofeifa et ál. (2008) al utilizar las formulaciones denominadas AMSF y AMSF+Intra, conformadas por combinaciones de sales minerales y fertilizantes comerciales, en la propagación in vitro de plantas de papa cv. Atzimba.

Aspectos morfológicos y fisiológicos de los brotes

Como se indica en el Cuadro 3, únicamente los brotes que crecieron en los tratamientos control (To), T3 y T5 mostraron 100% características morfológicas y fisiológicas normales: brotes erguidos con hojas expandidas, verdes y turgentes; en cambio en los tratamientos T6 y T7, solamente se registró 15% de brotes normales puesto que el resto mostraron deficiencias morfológicas y nutricionales: plantas raquílicas, hojas corchosas, cloróticas, con bordes necrosados y otras vitrificadas, por lo que fueron descartados para la fase de enraizamiento. En el resto de tratamientos ensayados el porcentaje de plantas normales fue variable (35–75%).

De manera general los tratamientos que mostraron menores concentraciones de nutrientes del medio de cultivo MS, también menor número de plantas normales con resultados dramáticos en los tratamientos T6, que no incorporaron AC y CH y T7, pero sí incorporó CH 250 mg.l⁻¹. Una característica frecuente de las plantas anormales es la clorosis que ha sido atribuida a desbalances minerales en el medio de cultivo, particularmente por altos niveles de K y P, que pueden causar una deficiencia fisiológica de Fe, tal como se observó en híbridos de *Eucalyptus* (Gribble et ál. 2002). Por otro lado, los fertilizantes inorgánicos que se adicionan como complementos a las sales minerales MS o a cualquier otra formulación de sales minerales convencionales, siempre incorporan impurezas o trazas de otros elementos, como cloruros y sodio, que no se consideran en los cálculos o que están contenidos en la formulación del producto comercial y que es imposible

obviarlos, pero que pueden influir significativamente en la nutrición, metabolismo y fisiología de los explantes (Taiz y Zieger 2006, Roussos et ál. 2007, Azofeifa et ál. 2008). En esta investigación una característica observada del Sulpomag fue la presencia de una importante cantidad de partículas sólidas de diferente tamaño, tanto como precipitados y en suspensión, las que se consideraron impurezas; sin embargo, no se descarta la posibilidad de que ejercieran alguna influencia en el crecimiento de los explantes.

Enraizamiento

En el Cuadro 4 se muestra los resultados obtenidos en el número de raíces formadas, altura de planta, tasa de crecimiento y peso fresco, después de 30 días de cultivo. El mayor número de raíces formadas se observó en el tratamiento T3 (10,4) seguido de los tratamientos T2 y T5

Cuadro 4. Efecto del fertilizante Sulpomag y las fuentes nitrogenadas caseína hidrolizada (CH) y agua de coco (AC) en el enraizamiento de brotes de banano (*Musa* sp., var. Cavendish), después de 30 días de cultivo.

Tratamiento ¹	Concentración (KNO ₃ +NH ₄ NO ₃) MS ²	Sustancias complejas ³		Respuesta ⁴			
		CH (mg.l ⁻¹)	AC (%)	Raíces (Nº)	Altura planta (cm)	Tasa crec. (cm)	Peso Fresco (g)
To (Testigo)	MS1/2	-	-	8,0 abcd	5,3 de	2,4 ab	2,3 d
T1	1/5	-	-	8,8 cde	4,6 cd	2,8 bc	1,9 cd
T2	1/5	250	-	10,3 e	4,4 bc	2,6 b	2,0 cd
T3	1/5	500	-	10,4 e	4,7 cd	2,7 b	2,0 cd
T4	1/5	-	10	8,3 bcd	4,8 cde	2,8 bc	1,7 bc
T5	1/5	-	20	9,3 de	5,5 e	3,5 c	2,3 d
T6	1/10	-	-	n.e	n.e	n.e	n.e
T7	1/10	250	-	n.e	n.e	n.e	n.e
T8	1/10	500	-	7,3 abc	3,8 ab	2,1 ab	1,4 ab
T9	1/10	-	10	6,6 a	3,3 a	1,8 a	1,1 a
T10	1/10	-	20	6,9 ab	3,4 a	1,6 a	1,1 a
				C.V.=19,9%	C.V.=16,3%	C.V.=32,4%	C.V.=26,6%

¹ CH, caseína hidrolizada; AC, agua de coco.

² Valores con letras distintas indican diferencias significativamente por la prueba de Duncan p≤0,05.

(10, 2 y 9,3 raíces formadas, respectivamente), en tanto que el menor número se observó en los tratamientos T10 y T9 (6,9 y 6,6 raíces formadas, respectivamente). La prueba de significación de Duncan indicó que el tratamiento T3 si bien resultó superior, estadísticamente fue igual a los tratamientos T2 y T5. Estos resultados difieren de los observados en los cultivares Curraré, Dominico, Gran Enano y Valery, en 45 días de cultivo, donde el promedio en número de raíces formadas fue 6,8 raíces.planta⁻¹ (Sandoval et ál. 1991) y en el cv. Gros Michel, con 1–3 raíces.planta⁻¹ (Portero 1991); sin embargo, resultaron más cercanos con lo informado por GÜbbük y Pekmezci (2004) con 10–12 raíces.planta⁻¹.

La longitud de raíces (datos no mostrados en tabla), en los tratamientos T1, T3 y T5, fue superior a 5,0 cm, mientras que en el resto de tratamientos ensayados varió entre 3,5 a 5,0 cm. En los cultivares Curraré, Dominico, Gran Enano y Valery, en 45 días de cultivo, la longitud promedio de raíces fue 1,1 cm.planta⁻¹ (Sandoval et ál. 1991) lo que se atribuyó a que estos autores no incorporaron reguladores de crecimiento al medio de cultivo de enraizamiento. Un caso similar se observó en la propagación in vitro de plántulas de *Laelia anceps* donde la mayor formación y longitud de raíces ocurrió en los complejos fertilizantes Peters 25% (24-8-16) y Floren 25% (10-15-5), utilizados como sustitutos de las sales minerales MS, sin reguladores de crecimiento (Romero-Tirado et ál. 2007).

Sobre altura de planta, el mayor valor correspondió al testigo (To) (5,3 cm) seguido de los tratamientos T4 y T3 (4,8 y 4,7 cm, respectivamente), en tanto que los menores valores correspondieron a los tratamientos T9 y T10 (3,4 y 3,3 cm, respectivamente). La prueba de significación de Duncan indicó que los tratamientos To, T4 y T3 resultaron estadísticamente iguales. La altura de planta durante el enraizamiento suele ser mayor que la altura de planta alcanzada durante el establecimiento del cultivo, tal como fue observada en la investigación que se presenta aunque estos datos resultaron inferiores a los informados por Sandoval et ál. (1991), para los

cultivares de banano Curraré, Dominico, Gran Enano y Valery, en 45 días de cultivo, cuyas plantas alcanzaron una altura promedio de 10,4 cm; como se indicó líneas arriba, esta significativa diferencia obedecería al método utilizados por dichos autores al estimar la altura de las plantas. Los resultados de la presente investigación están en concordancia con lo informado por Strangsam y Kanchanapoom (2007) quienes en cultivo de *Musa AA* de los grupos 'Kluai Sa' y 'Kluai Leb Mue Nang' obtuvieron brotes de 4–5 cm de altura y por GÜbbük y Pekmezci (2004) quienes obtuvieron plantas de banano de 4,4–5,9 cm de altura.

Sobre la tasa de crecimiento, el mayor valor correspondió al tratamiento T5 (3,5 cm) seguido de los tratamientos T1 y T4 (2,8 cm), mientras que la menor tasa de crecimiento se observó en los tratamientos T9 y T10 (1,8 y 1,6 cm, respectivamente). La prueba de significación de Duncan indicó que el tratamiento T5 resultó estadísticamente superior a los tratamientos T1 y T4 que resultaron estadísticamente iguales. Si bien no se cuenta con información sobre tasa de crecimiento in vitro de plantas de banano y plátano, en otras especies como en *Paphiopedilum exstaminodium* y *P. caudatum* (Rodríguez 2000) y *Stanhopea tigrina* (Moreno y Menchaca 2007) las mayores tasas de crecimiento se observaron en los tratamientos suplementados con agua de coco y pulpa de plátano, tan igual a lo observado en esta investigación.

En cuanto al peso fresco, el mayor valor correspondió a los tratamientos testigo (To) y T5 (2,3 g) seguidos de los tratamientos T2 y T3 (2,0 g), mientras que los menores valores correspondieron a los tratamientos T10 y T9 (1,1 g). La prueba de significación de Duncan indicó que el tratamiento To resultó estadísticamente igual al tratamiento T5. En los cultivares de banano, Curraré, Dominico, Gran Enano y Valery, en 45 días de cultivo, el peso fresco promedio fue 2,3 g, cifra igual a la reportada en la investigación que se presenta, lo que ciertamente es una consecuencia del metabolismo de nutrientes y el almacenamiento de sustancias de reserva en las yemas, tal como se observó en los híbridos de cereza Inmil

GM9 donde los mayores valores de peso fresco se correlacionaron con una mayor absorción de macroelementos de los tallos que se expresó en un mayor crecimiento y multiplicación (Djurdjina et ál. 2001).

Por otro lado, durante el proceso de enraizamiento de brotes se observó, también, la formación de 2–5 nuevos brotes en los tratamientos T4 y T5 en alrededor del 80% de los explantes, mientras que en los tratamientos To y T1 no hubo formación de nuevos brotes y en los otros tratamientos evaluados se formó solamente un brote, en alrededor del 20% de los explantes (datos no mostrados en cuadro). Es posible que la mayor formación de brotes en los tratamientos T4 y T5 sea consecuencia de la alta tasa de BAP, utilizada en la fase anterior de multiplicación, y del agua de coco.

Aclimatación

La tasa de supervivencia, en condiciones de invernadero fue 100%, en las plántulas crecidas en todos los tratamientos ensayados; sin embargo, la tasa de supervivencia en campo definitivo fue 95%, cifra muy semejante a lo reportado en trabajos similares, al utilizar incluso otros tipos de componentes como humus de lombriz, entre otros (Sandoval et ál. 1991, Canchignia et ál. 2007).

CONCLUSIONES

El cultivo orgánico del banano exige que los productores cumplan un estricto reglamento entre cuyas normas se establece la no fertilización con nitrato de amonio (NH_4NO_3) y nitrato de potasio (KNO_3) e incluso en los medios de cultivo utilizados en la micropropagación in vitro. Es por ello que en la producción de plantas in vitro de *Musa* sp., cv. Cavendish, en las áreas agrícolas de Sullana (Piura, Perú), tanto en las fases de inducción de brotes como de enraizamiento se ensayaron varios tratamientos de medio de cultivo donde destaca el tratamiento que incorporó el fertilizante inorgánico Sulpo-mag 0,1096 g.l⁻¹, 1/5 de NH_4NO_3 y KNO_3 (330 y

380 mg.l⁻¹, respectivamente) del medio de cultivo MS, los micronutrientes MS y agua de coco 20%, observándose 5,4 brotes/explante con altura de 1,6 cm y 100% de plántulas normales, que superaron al testigo que incorporó las sales minerales MS en su concentración total, mientras que el número de raíces formadas fue de 9,3/explante en el mismo medio de cultivo suplementado con AIB 0,2 mg.l⁻¹ y CA 0,25%, sustituyendo a los reguladores de crecimiento utilizados en la fase de inducción de brotes. Las plántulas no mostraron deficiencias fisiológicas y alcanzaron una tasa de aclimatación y transferencia a suelo de 95%.

LITERATURA CITADA

- AGRODATA. 2008. AGRODATA, Orgánicos. Banano orgánico: exitosa experiencia de pequeños productores. Dirección de Agronegocios del Ministerio de Agricultura. La Revista Agraria 9 (98):1-16.
- ALVARD D., COTE 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* 32:55-60.
- AZOFEIFA A., GUEVARA E., JIMÉNEZ V.M. 2008. Uso de abonos foliares comerciales en la elaboración de medios de cultivo in vitro. *Agronomía Costarricense* 32:149-160.
- BANERJEE N., DE LANGHE E. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of *Musa* (banana and plantain). *Plant Cell Reports* 4:351-354.
- BERG L.A., BUSTAMANTE M. 1974. Heat treatment and meristem culture for the production of virus-free bananas. *Phytopathology* 64:320-322.
- CANCHIGNIA H.F., RAMOS L. 2004. Micropropagación de plátano variedad Barraganete. Informe Técnico s/n. Unidad de Investigación Científica y Tecnológica. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. 6 p.
- CANCHIGNIA H.F., SIGCHA L.E., TOAQUIZA J.P., RAMOS L.E., SAUCEDO S.G., CARRANZA M.S., CEVALLOS O.F. 2007. Alternativas para la propagación in vitro de plátano variedad Maqueño (*Musa balbisiana* AAB). Informe Técnico s/n. Unidad de Investigación Científica y Tecnológica. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. 15 p.
- CARRANZA D., HERRERA L., FRANCO C.M., GARCÍA M., DELGADO, M.S., RAMOS N.

2006. *Bacillus subtilis*, contaminante bacteriano en la micropropagación de bananos (cv. FHIA-18, AAAB). Centro Agrícola 33:25-30.
- COLMENARES M., GIMÉNEZ C. 2003. Multiplicación in vitro *Musa* spp., mediante sistema de inmersión temporal. Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ) 20:468-477.
- DJURDJINA R., SARIĆ M., CERović R., ČULAFIĆ L. 2001. Changes in macroelement content of the media and I sweet cherry Inmil GM9 shoots during in vitro culture. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 76:295-299.
- GAMBORG O.L., MILLER R.A., OJIMA K. 1968. Nutrient requirements on suspensions cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50:151-158.
- GANAPATHI T.R., MOHAN J.S.S., SUPRASANNA P., BAPAT V.A., RAO P.S. 1995. A low-cost strategy for in vitro propagation of banana. Current Science 68:646-650.
- GE L., YONG J.W., GOH N.K., CHIA L.S., TAN S.N., ONG E.S. 2005. Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. Journal of Chromatography 829:26-34.
- GE L., YONG J.W., TAN S.N., YANG X.H., ONG E.S. 2006. Determination of cytokinins in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry. Electrophoresis 27:2171-2181.
- GEORGE E.F., DE KLERK G.J. 2008. The components of plant tissue culture media. 1- Macro- and micro-nutrients, pp. 65-113. In: E.F. George, M.A. Hall y G.J de Klerk (eds.). Plant propagation by tissue culture. Vol. 1. The background. 3^{era} edit. Springer, Dordrecht, Holland.
- GRIBBLE E.K., CONROY J.P., HOLFORD P., MILHAM P.J. 2002. In vitro uptake of minerals by *Gypsophila paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation. Australian Journal of Botany 50:713-723.
- GÜBBÜK H., PEKMEZCI M. 2004. In vitro propagation of some new banana types (*Musa* spp.). Turkish Journal of Agriculture and Forestry 28:355-361.
- GUTIÉRREZ C. 1996. Propagación clonal in vitro de *Cattleya* por medio de meristemas. In: Memoria X Congreso Nacional Agronómico y de Recursos Naturales. Vol. 1. San José, Costa Rica. P. 302. EUNA.
- HARDY I., DE GARCÍA E. 1994. Micropropagación de bananos (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish. Phyton 55:31-41.
- IAEA (ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGÍA ATÓMICA). 2004. Informe Anual 2004. Viena, Austria. 99 p.
- IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- KRIKORIAN A.D. 1991. Propagación clonal in vitro, pp. 95-125. In: W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds.). Cultivo de Tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
- KRIKORIAN A.D., CRONAUER S.S. 1984. Banana, pp. 327-348. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato y Y. Yamada (eds.). Handbook of Plant Cell Culture. Mac Millan Publishing Co. New York.
- LEIFERT C., WAITES W.M. 1993. Dealing with microbial contaminants in plant tissue and cell culture: hazard analysis and critical control points, pp. 278-283. In: Physiology, Growth and Development of Plant in Culture. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- MA S.S., SHII C.T. 1972. In vitro formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. Chung-Kuo Yuan I Hsueh Hui (China Horticulture) 18:135-142.
- MOON H.K., PARK S.Y., KIM Y.W., KIM S.H. 2008. Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenation tissues from serial grafting of a mature *Kalopanax septemlobus* tree. In Vitro Cellular and Development Biology Plant 44:119-127.
- MORENO D., MENCHACA R.A. 2007. Efecto de los compuestos orgánicos en la propagación in vitro de *Stanhopea tigrina* Bateman (Orchidiaceae). Foresta Veracruzana 9:27-32.
- MOUTIA M., DOOKUN A. 1999. Evaluation of surface sterilization and hot water treatment on bacterial contaminants in bud culture of sugar cane. Experimental Agriculture 35:265-274.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15:473-497.
- NIEDZ R.P., EVENS T.J. 2007. Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. In Vitro Cellular and Development Biology – Plant 43:370-381.
- PEÑA Y.J., JUÁREZ J., GÓMEZ L., JERÓNIMO J.L., GARCÍA I., GONZÁLEZ J.A., ROBERT M.L. 2010. Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) cultured in vitro using juvenile and mature tissues: an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. In Vitro Cellular and Development Biology–Plant 46:149-160.
- PILLAY M.A., TENKOUANO A., UDE G., ORTIZ R. 2004. Molecular characterization of genomes in *Musa* and its applications, pp. 271-286. In: S.M. Jain y R. Swennen (eds.). Banana Improvement: Cellular, Molecular Biology and Induced Mutations. Science Publishers Inc. Enfield (NH), USA.
- POLLOCK M.A., OPPENHEIMER D.G. 1999. Inexpensive alternative to MS medium for selection of *Arabidopsis* plants in culture. Bio/Technique 26:254-257.

- PORTERO S. 1991. Propagación clonal mediante el cultivo de ápices e inducción de callos en plátano (*Musa* sp.) in vitro. UNPRG, Lambayeque, Perú. 82 p.
- REGLAMENTO TÉCNICO PARA LOS PRODUCTOS ORGÁNICOS. 2006. Ley N° 29196, Ley de Promoción de la Producción Orgánica o Ecológica. Ministerio de Agricultura. Lima, Perú 9 p.
- RODRÍGUEZ M. 2000. Germinación y desarrollo in vitro de *Paphiopedilum extaminodium* y *P. caudatum* (Orchidiaceae), especies en peligro de extinción. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 56 p.
- ROMERO R., LUNA B., BARBA A. 2007. Uso de complejos comerciales como sustitutos de componentes del medio de cultivo en la propagación in vitro de *Laelia anceps*. *Lankesteriana* 7:353-356.
- ROUSSOS P.A., GASPARATOS D., TSANTILI E., PONTIKIS C.A. 2007. Mineral nutrition of jojoba explants in vitro under sodium chloride salinity. *Scientia Horticulturae* 114:59-66.
- SANDOVAL J.A., BRENES G., SÁNCHEZ L.P. 1991. Micropropagación de plátano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico N° 186. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 24 p.
- SIMMONDS N.W., SHEPHERD K. 1956. The taxonomy and origins of cultivated bananas. *The Journal of the Linnean Society Botany* 55:302-312.
- STRANGSAM A., KANCHANAPOOM K. 2007. Establishment of in vitro culture of *Musa* AA group 'Kluai Sa' and *Musa* AA group 'Kluai Leb Mue Nang' and the analysis of ploidy stability. *Science Asia* 33:437-442.
- TAIZ L., ZEIGER E. 2006. *Plant Physiology*. 4ta. Ed. Sinauer Associate, Sunderland, Mass., EUA. 764 p.
- THOMAS P. 2004. A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. *Current Sciences* 87:67-72.
- VALERIO R., DE GARCÍA E.C. 2008. Transformación genética de plátano (*Musa* sp., cv. Hartón) mediante biobalística aplicada a tejidos meristemáticos. *Interciencia* 33:225-231.
- VAN DEN HOUWE I. 1998. Elimination of endophytic bacteria from banana tissue cultures. *Annual Report INIBAP*. 12 pp.
- VASIL I.K. 2008. A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports* 27:1423-1440.

