

**ESTABLECIMIENTO Y MICROPROPAGACION MASIVA “IN VITRO” DE
MUSA BALBISIANA (HIBRIDO FHIA – 21), MEDIANTE EL CULTIVO DE
MERISTEMAS APICALES**

SIXTO CLAVER SANES ALVAREZ

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
2002.**

**ESTABLECIMIENTO Y MICROPROPAGACION MASIVA “IN VITRO” DE
MUSA BALBISIANA (HIBRIDO FHIA – 21), MEDIANTE EL CULTIVO DE
MERISTEMAS APICALES**

SIXTO CLAVER SANES ALVAREZ

**Trabajo de grado presentado para optar el título de Biólogo con énfasis en
Biotecnología.**

**DIRECTORES
JAVIER DARIO BELTRAN HERRERA Ph.D
RAFAEL ENRIQUE DURANGO ACOSTA
Ingeniero Agrónomo**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
2002.**

NOTA DE ACEPTACIÓN

Presidente

Jurado

Jurado

Sincelejo, Junio 12 del 2002

Solo el autor es responsable de las ideas expuestas en el presente trabajo
Artículo 12, ley 23 / 2000

DEDICATORIA

A Dios, padre todo poderoso, por haberme iluminado con la suficiente sabiduría hacia el camino correcto y por darme la inteligencia necesaria para alcanzar todas mis metas.

A mis padres, FELIPE SANES y NORMA ÁLVAREZ, quienes se esforzaron y me guiaron con sus consejos y su apoyo incondicional para poder cumplir mis sueños.

A mis hermanos, EDITH, ISMENIA, ANA y LUIS, por su apoyo y comprensión.

A INGRIS, a los profesores, amigos y a todas aquellas personas que con su confianza me animaron a seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

EL AUTOR EXPRESA SUS AGRADECIMIENTOS A :

A DIOS, por haberme dado sabiduría e inteligencia y permitir haber alcanzado este triunfo.

Al Doctor JAVIER DARIO BELTRÁN, ph.D, Fitopatología y a RAFAEL DURANGO ACOSTA, Ingeniero Agrónomo, por su orientación y tiempo dedicado en este trabajo de grado.

A los docentes: RUBEN DARIO PATILLO, REINALDO TRUJILLO, OCTAVIO ARZUZA y ENRIQUE FRANCO, por sus conocimientos.

A mis compañeros de Laboratorio: ALEXIS, ALEJANDRO, CARLOS, JORGE, MARIO, RAFAEL, ROBERTO, ROBINSON, ROCIO, SAIDY y WILLIAM, por su amistad y consejos.

A la UNIVERSIDAD DE SUCRE, por sus servicios.

Al CENTRO DE INVESTIGACIÓN CORPOICA, Regional 2, Cereté (Córdoba), por haber facilitado el material de FHIA-21.

Al programa de producción de semillas de ñame libre de patógenos, por su apoyo financiero.

A todas y cada una de las personas que, de una u otra forma colaboraron en la ejecución de este trabajo.

CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	19
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
2. JUSTIFICACIÓN	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. OBJETIVO GENERAL	24
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
4. MARCO REFERENCIAL	25
4.1. GENERALIDADES Y ASPECTO HISTORICO SOBRE MUSA BALBISIANA	25
4.2. PLATANO RESISTENTE A LA SIGATOCA NEGRA	26
4.2.1. Ficha descriptiva del genotipo Musa	26
4.3. BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL CULTIVO DE MUSACEAS	28
4.3.1. Ventajas del cultivo “ <u>in vitro</u> ”	28
4.3.2. Desventajas de cultivo “ <u>in vitro</u> ”	29
4.4. CULTIVO “ <u>IN VITRO</u> ” DE MERISTEMOS APICALES	30
4.5. MEDIOS DE CULTIVOS	31
4.5.1. Ingredientes	31

4.5.1.1. Sales inorgánicas. Mezcla de sales	31
4.5.1.2. Compuestos orgánicos	33
4.5.1.3. Materiales inerte de soporte	35
4.6. AGENTES DESINFECTANTES	35
4.7. CONDICIONES AMBIENTALES DEL CULTIVO	36
5. METODOLOGÍA	37
5.1. LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO	37
5.2. PROCEDIMIENTO	37
5.2.1. Selección de plantas madres.	37
5.2.2. Extracción y desinfección de los explantes.	37
5.2.3. Siembra.	39
5.2.4. Etapa de establecimiento del cultivo.	40
5.2.5. Etapa de multiplicación.	40
5.2.6. Etapa de enraizamiento de las plántulas	41
5.3. VARIABLES E INDICADORES	42
5.3.1 Manejo de Variables	43
5.4. DISEÑO ESTADÍSTICO.	45
5.4.1. Distribución de los tratamientos en los estantes	46
6. RESULTADOS	51
6.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES	51
6.2. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO “ <u>IN VITRO</u> ”.	54
6.3. ETAPA DE MULTIPLICACIÓN DE LOS BROTES.	58
6.3.1. Producción de brotes.	59

6.3.2.	Tasa de multiplicación de los brotes.	65
6.3.3.	Número de hojas por explantes.	69
6.4.	ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DE LAS PLANTULAS.	72
6.4.1.	Número de raíces por explantes.	72
6.4.2.	Longitud de las raíces de los explantes.	75
7.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.	78
7.1.	ETAPA DE DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES.	78
7.2.	ETAPA DE ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO " <u>IN VITRO</u> ".	80
7.3.	ETAPA DE MULTIPLICACIÓN DE LOS BROTES.	81
7.3.1.	Producción de brotes.	81
7.3.2.	Tasa de multiplicación de los brotes.	83
7.3.3.	Número de hojas por explantes.	83
7.4.	ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DE LAS PLANTULAS.	84
8.	CONCLUSIONES.	87
9.	RECOMENDACIONES.	89
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	91
	ANEXOS	96

LISTA DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1. Medio básico de murashige y skoog (1962)	32
Cuadro 2. Variables e indicadores para la etapa de desinfección de los explantes.	42
Cuadro 3. Variables e indicadores para la etapa de establecimiento del cultivo “ <u>in vitro</u> ”	42
Cuadro 4. Variables e indicadores para la etapa de multiplicación	42
Cuadro 5. Variables e indicadores para la etapa de enraizamiento	43
Cuadro 6. Manejo de variables para la etapa de desinfección de los explantes.	43
Cuadro 7. Manejo de variables para la etapa de establecimiento del cultivo “ <u>in vitro</u> ”.	43
Cuadro 8. Manejo de variables para la etapa de multiplicación.	44
Cuadro 9. Manejo de variables para la etapa de enraizamiento.	45
Cuadro 10. Distribución completamente al azar de los tratamientos de la etapa de desinfección en los entrepaños del estantes.	46
Cuadro 11. Distribución completamente al azar de los tratamientos de la etapa de establecimiento del cultivo “ <u>in vitro</u> ” en los entrepaños del estantes.	47
Cuadro 12. Distribución de los tratamientos en bloques al azar de la etapa de multiplicación del cultivo “ <u>in vitro</u> ” en los entrepaños del estantes.	48
Cuadro 13. Distribución de los tratamientos en bloques al azar de la etapa de enraizamiento de las plántulas en los entrepaños de los estantes.	49

Cuadro 14. Resultado final de la etapa de desinfección de los explantes , utilizando diferentes concentraciones de NaOCl.	52
Cuadro 15. Resultados de la evaluación final en la etapa de iniciación, utilizando medio básico MS con diferentes concentraciones de agar.	56
Cuadro 16. Producción de brotes por tratamiento en cada una de las divisiones de la multiplicación " <u>in vitro</u> " de <i>Musa baibisiana</i> , híbrido FHIA-21.	60
Cuadro 17. Tasa de multiplicación promedia de los explantes hasta la sexta división en la micropropagación del híbrido FHIA-21.	66
Cuadro 18. Número promedio de hojas en la sexta división, durante la multiplicación del híbrido FHIA-21.	71
Cuadro 19. Número promedio de raíces del híbrido FHIA-21, en los diferentes tratamientos durante la etapa de enraizamiento.	74
Cuadro 20. Longitud promedia de las raíces a los 28 días después de la siembra, en los diferentes medios de enraizamiento.	76

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Aspecto visual de las plantas madres.	37
Figura 2. Forma de los rizomas del híbrido FHIA-21, utilizado en la primera desinfección.	39
Figura 3. Tamaño del ápice meristemático utilizado para la siembra	39
Figura 4. Ápice meristemático dividido en cuatro segmentos iguales para la siembra en los medios de multiplicación	41
Figura 5. Porcentajes de supervivencia, contaminación y mortalidad de los explantes en diferentes concentraciones de NaOCl, durante la etapa de desinfección.	54
Figura 6. Porcentaje de supervivencia y mortalidad de los explantes del Híbrido FHIA-21, en diferentes concentraciones de agar.	58
Figura 7. Ubicación de las plántulas del híbrido FHIA-21 en el cuarto de crecimiento.	58
Figura 8. Apariencia de los brotes desarrollados en el tratamiento K, en la etapa de multiplicación.	59
Figura 9. Aspecto de las explantes sembrados en los medios líquidos durante la etapa de Multiplicación.	61
Figura 10. Explantes en forma de roseta desarrollados en medios semilíquidos, correspondiente a los tratamientos F , G, E y H, durante la etapa de multiplicación.	62
Figura 11. Apariencia de los brotes en los tratamientos M y N, durante la etapa de multiplicación.	62
Figura 12. Desarrollo de raíces en medios de cultivos gelificados con agar pero sin BAP, durante la etapa de multiplicación.	63

Figura 13. Producción de brotes promedios del híbrido FHIA-21, en diferentes concentraciones de agar y BAP durante la etapa de multiplicación.	64
Figura 14. Tasa de multiplicación de los tratamientos K, M y J hasta la sexta división.	67
Figura 15. Aspecto visual de la tasa de multiplicación correspondiente a los tratamientos K, M y J.	67
Figura 16. Tasa de multiplicación promedia de cada uno de los tratamientos en la etapa de multiplicación.	70
Figura 17. Aspecto visual de la cantidad de hojas del híbrido FHIA-21, en los tratamientos N y K, durante la etapa de multiplicación.	72
Figura 18. Número de raíces producidas en los tratamientos E y G, durante 21 días en la etapa de enraizamiento.	73
Figura 19. Relación del número y longitud de las raíces a los 28 días después de la siembra con los diferentes tratamientos utilizados en la etapa de enraizamiento	77

LISTA DE ANEXOS

	Paginas
Anexo 1. Formato para la recolección de datos en las etapas de desinfección y establecimiento del cultivo " <u>in vitro</u> " de <i>Musa babisiana</i> , híbrido FHIA-21.	103
Anexo 2. Formato para la recolección de datos en las etapas de multiplicación y enraizamiento del cultivo " <u>in vitro</u> " de <i>Musa babisiana</i> , híbrido FHIA-21.	104
Anexo 3. Valores promedios de dos replicas realizada en cada tratamientos de la etapa de desinfección.	106
Anexo 4. Análisis de varianza del número de explantes vivos, en la etapa de desinfección.	109
Anexo 5. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de explantes vivos en la etapa de desinfección.	110
Anexo 6. Análisis de varianza del número de explantes contaminados, en la etapa de desinfección.	111
Anexo 7. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de explantes contaminados en la etapa de desinfección.	112
Anexo 8. Análisis de varianza del número de explantes muertos, en la etapa de desinfección.	113
Anexo 9. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de explantes muerto en la etapa de desinfección.	114
Anexo 10. Valores promedios de dos replicas realizado en cada tratamiento en la etapa de establecimiento del cultivo " <u>in vitro</u> ".	115

Anexo 11. Análisis de varianza del número de explantes vivos, en la etapa de establecimiento del cultivo “ <u>in vitro</u> ”,	116
Anexo 12. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de explantes vivos en la etapa de establecimiento del cultivo “ <u>in vitro</u> ”	118
Anexo 13. Análisis de varianza del número de explantes muertos en la etapa de establecimiento del cultivo “ <u>in vitro</u> ”,	119
Anexo 14. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de explantes muertos en la etapa de establecimiento del cultivo “ <u>in vitro</u> ”.	120
Anexo 15. Análisis de varianza de la producción de brotes del híbrido FHIA-21 en la etapa de multiplicación.	121
Anexo 16. Prueba de Rango Múltiple de Duncan para el número de brotes desarrollados en la etapa de multiplicación.	122
Anexo 17. Análisis de varianza de la tasa de multiplicación de <i>Musa balbisiana</i> , híbrido FHIA-21 en la etapa de multiplicación.	123
Anexo 18. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para la tasa de multiplicación de los explantes.	124
Anexo 19. Análisis de varianza del número promedio de hojas por explantes en la sexta división de la etapa de multiplicación de <i>Musa balbisiana</i> , híbrido FHIA-21.	125
Anexo 20. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de hojas por explantes en la sexta división de la etapa de multiplicación.	127
Anexo 21. Análisis de varianza del número promedio de raíces producida en cada tratamiento, durante la etapa de enraizamiento.	128
Anexo 22. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número promedio de raíces producida por cada tratamiento en la etapa de enraizamiento.	129

Anexo 23. Análisis de varianza de la longitud promedio de las raíces, en la etapa de enraizamiento.	130
Anexo 24. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para la longitud promedio de las raíces en la etapa de enraizamiento.	131

RESUMEN

El cultivo “in vitro” es una técnica de cultivo de tejido, la cuál consiste en aislar una parte de una planta (órgano, tejidos o células), para cultivarlo en un medio nutritivo y en condiciones asépticas. Esta técnica es utilizada debido a la multiplicación rápida de individuos vegetales, de las cuales se obtiene un elevado número de explantes a partir de una planta donante.

Con este trabajo se estandarizó un protocolo para la producción de grandes cantidades de plántulas de plátano, híbrido FHIA -21 mediante el cultivo “in vitro” de meristemas apicales, con el objeto de contribuir a la repoblación de las zonas donde se cultivaban el plátano, en el Departamento de Sucre, el cuál desapareció de la zona debido a problemas fitosanitarios y a los altos costos de producción, causado por la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella ljiensis* var. *antiformis*). Para este fin se determinaron las condiciones óptimas del cultivo; como la concentración de NaOCl para la etapa de desinfección, en esta etapa la concentración de NaOCl al 2.0% fue la preparación más útil como germicida ya que eliminó de la superficie de los explantes el gran número de microorganismos que contaminan al medio, sin causar lesiones en los tejidos interno y externo de los explantes. Para el establecimiento de los explantes el medio MS. gelificado con 0.3 y 0.6% permitió un 93.75% de supervivencia de los meristemas apicales; estos medios permitieron el sostenimiento y toma de nutrientes a los explantes del híbrido FHIA-21, sin afectar su crecimiento y desarrollo. Además, en la etapa de multiplicación, los mejores resultados se obtuvieron en el medio nutritivo MS. con 5 mg/l de BAP y gelificado con 0.6% de agar; En este medio la producción de brotes fue de 2543.8, con una tasa de multiplicación de 5 y cada una de las plántulas tiene en promedio 3,25 hojas hasta la sexta división. En la etapa de enraizamiento el medio MS. gelificado con 0.6% de agar permitió que el sistema radical se desarrollara óptimamente, además, dada la consistencia que ofrece este medio de cultivo se facilita la extracción de las plántulas y de su sistema radical sin daño mecánico.

SUMARY

The culture "in vitro" is a technique of weaves culture, which consists of isolating a part of a plant (organ, weaves or cells), to cultivate it in nutritious means and aseptic conditions. This technique is used due to the fast multiplication of vegetal individuals, from which a high number of explants from a plant is obtained donor. With this work a protocol for the production of great amounts of plants of banana was standardized, FHIA-21 hybrid by means of culture "in vitro" of apical meristem, with the intention of contributing to the repopulation of the zones where they cultivated the banana, in the Departament of Sucre, which disappeared of the zone due to fit sanitary problems and to the high production costs, caused by black the Sigatoka disease (*Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*). For this aim the optimal conditions of the culture were determined; like the concentration of NaOCl for the disinfection stage, in this stage the concentration of NaOCl to the 2,0% was the most useful preparation as sterilizer, because eliminated of the surface of the explants the great number of microorganisms that contaminate to means without causing injuries in internal and external weaves of the meristem. For the establishment of the explants the average MS. gelled with 0.3 and 0.6 % allowed 93,75% of apical survival of meristem; these means allowed to the support and taking of nutrients to the explants of hybrid FHIA-21, without affecting their growth and development. In addition, in the multiplication stage, the best results were obtained in nutritious MS. with 5 mg/l of BAP and gelled means with 0.6% of agar; in this means the production of buds was of 2543.8, with a rate of multiplication of 5 and each one of the plants has in average 3.25 leaves until the sixth division. In the rooting stage the average MS. gelled with 0,6% of agar allowed that the radical system developed very optimally, in addition given the consistency that offers east means of culture facilitates the extraction of the plants and of its radical system without mechanical damage.

INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos comestibles, perteneciente a la familia de las musáceas, son considerados como componentes básicos en la dieta cotidiana del pueblo Colombiano.

El plátano en Colombia, se cultiva en todos los hábitats ecológicos, comprendidos desde el nivel del mar hasta cerca de los 2000 mts., se constituye junto con el maíz, la yuca y los pastos en un cultivo colonizador por excelencia. (Belalcazar, 1990).

La mayor área cultivada se encuentra en la Región Andina, con el 70% de la superficie cultivada y de la producción nacional, seguida por la Región Caribe, con el 13%. En estas zonas se ubica el mayor porcentaje de la población colombiana. Las otras áreas productoras se sitúan en la Costa Pacífica, la Orinoquía y la Amazonía. (Plan Operativo 1.998).

El desarrollo de la agricultura, a través de los años, responde al esfuerzo en el mejoramiento de la calidad y aumento de la producción de los cultivos de interés para el bienestar de la humanidad. Sin embargo, en el cultivo de plátano se utiliza métodos tradicionales de propagación que son dispendiosos y de baja eficiencia: de una planta se extraen solamente tres o cuatro colinos por año. Durante el ciclo de crecimiento las plantas de plátano y banano emiten numerosas yemas laterales, las cuales mediante técnicas como el cultivo “ in vitro” permitirían su utilización como material de propagación. (Orozco y Londoño, 1986).

Esta metodología es aplicable a materiales escasos o de características genéticas útiles, tales como aquellos con resistencia a la Sigatoka negra. Las características favorables que

aportarían el cultivo “in vitro” al desarrollo de la investigación y al cultivo de plátanos y bananos son: Rapidez en la propagación del material valioso; alta tasa de propagación; sanidad a problemas sistémicos (patógenos); facilidad de manejo y transporte; inducción y regeneración de mutantes importantes útiles en el mejoramiento. (Orozco y Londoño 1986).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El plátano (*Musa balbisiana*) y el banano (*Musa acuminata*), son plantas tropicales perennes que tiene una gran importancia estratégica dentro del sector rural, ya que ocupa un lugar destacado en el suministro urbano de alimentos; hacen parte de la dieta alimenticia costeña y se exporta a los Estados Unidos con fines de consumo fresco. A pesar de la importancia del cultivo y de las grandes potencialidades esta especie se ha visto afectada por problemas fitosanitarios.

En los últimos 15 años, las plantas de plátano Hartón muestran en las hojas, un gran número de rayas y manchas, que son más notorias en el envés de las hojas, debido a la presencia de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella ljiensis* var. *uniformis*), enfermedad que ha afectado drásticamente a unas 1408 Has. en el Departamento de Sucre, disminuyendo en 1205 kg./has. los rendimientos de cultivo y limitando la rentabilidad de éstos, mermando la economía de muchas familias campesinas. Como consecuencia de los factores antes mencionados se disminuyó en un 46,3% el área cultivada de esta especie, aumentando el índice de desempleo rural. (Ministerio de agricultura, 2001)

Las áreas afectadas por esta enfermedad, no han sido recuperadas en su totalidad durante estos años, debido a la susceptibilidad del plátano hartón a la Sigatoka negra y a los métodos de propagación actuales, que son dispendiosos y de baja eficiencia.

La Sigatoka negra ataca directamente las hojas de banano y plátano, produciendo el secamiento y la muerte de la superficie foliar, ocasionando marcada reducción del área fotosintética de la planta. El efecto sobre el racimo es indirecto; la severidad y duración del ataque depende del desarrollo del mismo. En ataques severos los racimos son pequeños, hay reducción en tamaño y llenado de los frutos, la coloración de la pulpa es ocre salmón y

la maduración es prematura, lo cual ocasiona rechazo de cargamento a los sitios donde la fruta se exporta. (I. C. A., 1997)

El presente proyecto pretende contribuir en la solución de este problema mediante la producción masiva de plantas de plátano (FHIA – 21) o de otras variedades, resistente a la Sigatoka negra con buenos rendimientos en cosechas, mediante la utilización de la técnica del cultivo “in vitro”.

2. JUSTIFICACIÓN

El plátano es un cultivo tradicional ligado a la economía de los habitantes del Departamento de Sucre, quienes lo cultivan en parcelas, con el fin de autoabastecerse y comercializar los excedentes en los mercados locales.

La producción de plátano Hartón ha sido afectada drásticamente por la enfermedad Sigatoka negra, la cual ha impactado social y económicamente las zonas plataneras en el Departamento de Sucre, produciendo una gran disminución en el área de siembra, en la rentabilidad y en la disponibilidad de semillas. Es así como la producción decayó de 15720 ton/año en 1986 a 8729 en el 2001. El área de siembra pasó de 2625 Has. en 1986 a 1217 en el 2001, circunstancia que ha afectado a unas 2200 familias campesinas.(Ministerio de agricultura, 2001).

Con la utilización del cultivo “in vitro” en el laboratorio de cultivos de tejido de la Universidad de Sucre se espera producir masivamente plantas de plátanos (FHIA - 21) o de otras variedades, productivas y tolerantes a factores fitosanitarios (Sigatoka negra), para que sean transferidos a las zonas productoras, a través de equipos de extensionistas, articulados con UMATAS, Ministerio de Agricultura y Sena ,para que de esta manera sean recuperadas a mediano plazo las zonas plataneras promisorias del Departamento de Sucre.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un protocolo para la producción masiva de plántulas de *Musa babisiana* (Híbrido FHIA – 21), mediante el cultivo “in vitro” de meristemas apicales.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la metodología apropiada para la desinfección de los explantes.
- Determinar la consistencia adecuada del medio (líquido, semilíquido, semisólido y sólido), para el establecimiento, la multiplicación y el enraizamiento.
- Valorar diferentes concentraciones de 6 – Benzilaminopurina (BAP), en la etapa de multiplicación.
- Evaluar diferentes concentraciones de Acido Naftalenoacético (ANA), en la etapa de enraizamiento.

4. MARCO REFERENCIAL

4.1. GENERALIDADES Y ASPECTO HISTÓRICO SOBRE MUSA BALBISIANA.

Los plátanos y los bananos pertenecen al género *Musa* propio de las regiones tropicales y subtropicales, y con mayor representación de importancia dentro de la familia de las Musáceas, comprendida en el grupo de las Monocotiledóneas. El género *Musa*, se ha destacado por su importancia en la alimentación humana y constituye uno de los productos de exportación más importante para la economía nacional.

Las especies más importante de este género son *Musa acuminata Colla* y *Musa balbisiana Colla*, por cuanto han contribuido por diversos procesos genéticos a la aparición de los plátanos y bananos comestibles. El origen de los cultivares se remontan a las especies silvestres diploides. Simmonds y Shepeerd (1955) puntualizan esta posición por medio de los estudios taxonómicos de manera que la ploidía y composición genómica de la gran variedad de clones son designados para *Musa acuminata* como “ genoma A” y para *Musa balbisiana* como “genoma B” dando origen a clones diploides, triploides y tetraploides. Los bananos utilizados como frutas (*Dessert bananas*) presentan dominancia *acuminata* (AAA) y tienen bajo contenido de almidón y mayor contenido de azúcares. Los plátanos de cocción (*Cooking bananas*) de dominancia *balbisiana* (ABB) tienen alto contenido de almidón (23%).

Estas especies son partenocárpicas y de semillas estériles, por lo tanto su propagación es asexual. En este sentido, la utilización de los sistemas “in vitro” permite la búsqueda de materiales resistentes a las enfermedades que atacan al plátano y banano, puesto que la mayoría de los clones comestibles son susceptibles a patógenos, tales como hongos, bacterias, virus y nemátodos, los cuales causan serias pérdidas en la producción (Rowe, 1981).

4.2. PLATANO RESISTENTE A LA SIGATOKA NEGRA.

El FHIA-21 constituye una alternativa para sustituir al plátano Hartón. Su resistencia a la Sigatoka negra, alto rendimiento y excelente calidad lo han colocado en un lugar preferente para consumo fresco o para procesamiento. Este plátano está siendo cultivado por pequeños agricultores y cooperativas en Honduras con excelentes resultados. Su rendimiento, bajo condiciones similares puede ser 2 a 3 veces el rendimiento del plátano Hartón. Producido técnicamente puede ser exportado a los mercados internacionales. Actualmente existen plantaciones comerciales de esta variedad en Honduras, Nicaragua, Ecuador y Colombia. (Corporación Fhia,1999)

4.2.1. Ficha descriptiva del genotipo musa

Nombre de la Variedad: FHIA-21

- **Origen:** FHIA, Honduras, Centro América
- **Nombre del Mejorador:** Phillip Rowe
- **Tipo:** Plátano Tipo Francés
- **Año de Generación:** 1987
- **Nombre Código:** FHIA SH-3460
- **Linaje:** AVP-67 (AAB) X SH-3142(AA)
- **Genoma/Ploidia:** AAAB
- **Uso:** Consumo procesado (hervido o frito, verde o maduro)

Características de la planta:**Morfológicas:**

- **Habito foliar:** Normal
- **Apariencia delseudotallo:** Brillante (no ceroso)
- **Altura:** 3.50 – 4.00 mts.
- **Tipo de Botella:** Normal (presente permanentemente)
- **Forma de Racimo:** Asimétrico
- **Posición del Racimo:** Ligeramente inclinado
- **Color de Frutos:** Verde claro
- **Forma de Frutos:** Recta en parte distal
- **Forma ápice del fruto:** Ligeramente puntiagudo

Fenológicas:

- **Duración primer ciclo vegetativo (siembra a floración):** 240-280 días
- **Duración primer ciclo productivo (pariación a cosecha):** 85-100 días
- **Días transcurridos de siembra a segunda floración:** 540-570 días

Producción:

- **Peso neto (sin raquis) de racimo:** 22-27 kg.
- **Número de dedos por racimo (sin desmane):** 120-150 dedos
- **Número de dedos/racimo (con desmane a cinco manos):** 70-80 dedos
- **Peso dedos individuales(con desmane a cinco manos):** 250-350 g

Reacción a enfermedades:

- **Sigatoka negra:** Tolerante
- **Mal de Panamá:** Tolerante
- **Nemátodos:** Suceptible a *Radopholus similis* y *Pra. tylenchus coffeae*
- **Pudrición de corona:** Desconocida

4.3. BIOTECNOLOGÍA APLICADA AL CULTIVO DE MUSACEAS.

Los procesos biotecnológicos fundamentados en la aplicación de los sistemas “in vitro” y el creciente interés en los últimos años han generado la Biotecnología Vegetal, la cual contribuye de manera eficaz a la solución de algunos problemas en cultivo de interés para la agricultura (Perea, 1990). La propagación clonal implica la reproducción de plántulas en condiciones asépticas, cuyas características fenotípicas y genotípicas son idénticas a las de la planta original. La regeneración de los vegetales a través de los sistemas “in vitro” puede ocurrir como una continuación del crecimiento y desarrollo de estructuras organizadas separadas de la planta (explante), tal como ocurre en los casos de meristemas apicales y laterales, o puede ser el resultado de un proceso de formación “de novo” a partir de células que pueden derivarse de órganos vegetativos somáticos o de estructuras sexuales y genéticamente de la planta (Krikorian, 1988)

4.3.1. Ventajas del cultivo “in vitro”

- Los cultivos se inician de partes muy pequeñas de las plantas (Explantes o explantos) y posteriormente se propagan los brotes. De ahí el término micro propagación para describir la propagación “in vitro”.

- La propagación se lleva a cabo en condiciones asépticas, libre de patógenos. Una vez los cultivos se han iniciado no se presentan pérdidas debido a enfermedades y las plantas producidas serán libres de bacterias y hongos y en algunos casos de virus.
- Como es posible un ajuste de los factores que influyen en la propagación vegetativa tales como nutrientes y niveles de reguladores de crecimiento, se consigue una tasa de propagación convencional y se puede producir mayor número de plantas en menor tiempo. Lo anterior puede acelerar la producción de nuevas variedades.
- Pueden producirse clones de muchas clases de planta que de otra manera serían lenta y difíciles (o imposibles), por medio de propagación vegetativa.
- La producción de plantas puede hacerse durante todo el año, pues es independiente de los cambios estacionales.
- El material reproducido vegetativamente puede almacenarse por largos periodos.
- Se requiere menos espacio de invernadero para fines de propagación y mantenimiento de plantas madres.
- Las plantas no necesitan atención entre los subcultivos y por lo tanto las labores de riego, control de maleza y fumigaciones quedan suprimidas.

4.3.2. Desventajas del cultivo “in vitro”.

- Para el éxito se requieren buenas habilidades en el manejo del material.
- Las facilidades e instalaciones para propagación son costosas.
- A veces se requieren métodos muy específicos para obtener resultados óptimos en las diferentes especies.

4.4. CULTIVO “ IN VITRO “ DE MERISTEMOS APICALES.

Mediante la técnica de cultivo de tejidos vegetales podemos estudiar diferentes fenómenos morfogénéticos que nos ayude a entender cuales son los factores fundamentales que intervienen en la morfogénesis y diferenciación de parte aislada de la planta, que están fuera de la influencias correlativas del resto de la misma. Se pueden cultivar varios tipos de tejidos, como protoplastos, callos, nucelas, óvulos, primordios foliares y meristemos apicales y laterales (Walkey, 1978). De estos tejidos, los meristemos apicales han sido los inóculos más efectivos para la producción de plantas completas en una amplia gama de cultivos económicamente importantes (Quak, 1977; Walkey, 1978).

Si se cultivan en un medio adecuado, los meristemos pueden regenerar plántulas completas más rápidamente que los tejidos de otra fuente; las plantas regeneradas usualmente retienen las características genéticas de los progenitores, lo que se debe a la naturaleza diploide de las células meristemáticas (Murashige, 1974).

El estudio detallado “in vitro” de los requerimientos nutricionales, hormonales y ambientales nos ayuda a entender los mecanismos reguladores que controlan la diferenciación de las plantas. De aquí la gran importancia de los meristemos de las plantas, pues se encuentran asociados con células altamente diferenciadas, además que el meristemo da origen a diversos tipos de células, tejidos y órganos para formar una planta completa; se perpetúa a si mismo, produciendo células que retienen su actividad meristemática.

El primer caso de regeneración de plantas a partir de brotes meristemáticos de banano se refiere a los trabajos de Ma y Shii (1972). En condiciones “in vitro” el meristema floral puede transformarse en un sistema multiplicador de brotes vegetativos adecuado para la micropropagación (Cronauer and Krikorian, 1985).

4.5. MEDIOS DE CULTIVOS.

Para crecer, las células requieren una variedad de nutrimentos orgánicos e inorgánicos; estos requerimientos se demuestran fácilmente en órganos y tejidos extirpado de plantas superiores e inferiores. Los nutrimentos orgánicos, al igual que los inorgánicos, se requieren en dos niveles: uno macro y otro micro. Generalmente las células en crecimiento pueden fabricar sus propias proteínas a partir de fuentes adecuadas de nitrógeno y carbohidratos suministrado por el medio de cultivo; sin embargo, existe además una cantidad de sustancias orgánicas adicionales que se requieren en cantidades mínimas y que son muy activas en el crecimiento.

4.5.1. Ingredientes.

Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en:

- Sales inorgánicas. Mezcla de sales.
- Compuestos orgánicos.
- Materiales inertes de soporte.

4.5.1.1. Sales inorgánicas. Mezcla de sales.

Se han llevado a cabo muchas investigaciones con el fin de optimizar las necesidades específicas de algunas plantas, lo cual ha traído como consecuencia la formulación de varias mezclas salinas.

La fórmula de Murashige y Skoog (MS)(1962), es alto en nitratos, potasio y amonio. En general se considera un medio alto en sales, en tanto que el medio Nitsch y Nitsch es mediano en sales, mientras que el White generalmente se considera como de bajo contenido de sal. Los medios de cultivos más utilizados para la supervivencia de los explantes son, el

Murashige y Skoog (MS), White, Gomborg, et al. (B5). El medio de cultivo más popular y utilizado en la regeneración de plántulas de plátano y banano es el MS (Tabla 1) (Roca, et al., 1991).

Cuadro 1. Medio básico de murashige y skoog (1962)

Constituyente	Mg/l	MM
Sales		
KNO ₃	1900	18.8
NH ₄ 2NO3	1650	20.6
C _a Cl ₂ . 2H ₂ O	440	3.0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370	1.5
KH ₂ PO ₄	170	1.25
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3	0.1
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6	0.03
H ₃ BO ₃	6.2	0.1
KI	0.83	0.005
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.25	0.001
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.0001
C _u SO ₄ . 5H ₂ O	27.8	0.1
FeSO ₄ . 7H ₂ O	37.3	
VITAMINAS		
Tiamina – HCl	0.4	5.92
Mioinositol	100	555.06

Fuente: ROCA,W.M. Cultivo de tejido en la agricultura. Colombia 1991.

4.5.1.2. Compuestos orgánicos.

Podemos clasificarlos en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se han obtenido buenos resultados cuando se emplean también ciertos aminoácidos y / o amidas, algunas purinas y pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos.

- **Carbohidratos.**

Cumplen en el medio dos funciones principales: son fuente de energía y mantienen en el medio un potencial osmótico determinado. La fuente de carbón más utilizada en los distintos medios es la sacarosa. Sin embargo, en ocasiones puede utilizarse la glucosa o la fructosa. La cantidad de sacarosa más frecuentemente adicionada al medio de cultivo fluctúa entre 20 a 30 g/l.

- **Sustancias hormonales.**

Las sustancias hormonales son las auxinas y las citocininas. Las concentraciones varían de especie a especie, pero las auxinas se usan en una concentración de 0.1 a 10.0 mg/l y las citocininas de 0.03 a 30.0 mg/l.

Las giberelinas (AG3) se emplea en algunas especies para obtener plantas libres de virus, principalmente de cultivos de ápices o meristemas. Su adición en el medio de cultivo no es crítica.

Los reguladores más utilizados para el crecimiento, son básicamente la citocinina y la auxina. Del primer grupo el 6-bencilamino purina (BAP) es imprescindible en los medios para procesos de multiplicación de banano, como lo prueba el hecho de que prácticamente todos los trabajos que han sido consultados reportan desde concentraciones tan bajas como 0,22 mg/l,(Banerjee, et al., 1986), hasta 10 mg/l. con buenos resultados. Las concentraciones mayores (15 mg/l. y más) afectan el desarrollo de los tallos, excepto en el

cultivo de Myzore (Mante and Tepper, 1983). Del segundo grupo el ácido Naftalenaacético (ANA), es utilizada por Cronauer and Krikorian, (1985) a razón de 1,0 mg/l., junto con 0,25% (peso a volumen W/V) de carbón activado, para estimular el desarrollo radical de las plantas procedentes de los ápices terminales de las flores de banano.

- **Vitaminas.**

Casi todo los medios utilizados en cultivo de tejidos contienen al menos alguna vitamina y en ocasiones se usan mezclas hasta de 10 vitaminas. El medio Linsmaier y Skoog consideran la Tiamina HCl. La mayoría de los cultivadores encuentran prudente una posición intermedia.

La tiamina HCl, se utiliza en todos los medios de cultivo en concentraciones del orden de 0,1 mg/l. (Sandoval Muller 1990); 0,4 mg/l. (Banerjee. et al., 1986, Dore. et al., 1983), 0,5 mg/l. (Vuylsteke, et al., 1988), 1 mg/l. (Angarita, et al., 1991). La glicina (2,0 mg/l), el ácido nicotínico (0,5 mg/l.) y la piridoxina HCl (0,5 mg/l.), han sido utilizadas por Sandoval y Muller, (1990); y Banerjee, et al., (1986).

- **Aminoácidos y amidas.**

Los requerimientos de aminoácidos y/o amida se pueden determinar rápidamente por medio de la adición de un hidrolizado proteico. Cualquier efecto positivo puede ser investigado por una adición posterior de una mezcla de aminoácido y amida en lugar del hidrolizado. Los aminoácidos y amidas que han demostrado tener efecto benéfico son la L- arginina, ácido L-aspartico, L-asparagina, ácido L-glutámico y L- glutamina.

- **Otros compuestos orgánicos.**

Entre los hexitoles el inositol tiene un efecto estimulante muy significativo. La concentración de inositol comúnmente empleada es de 100 mg/l. La adenina o el sulfato de

adenina frecuentemente favorece la formación de tallos “in vitro”. Su concentración varía de 40 a 160 mg/l.

Las bases nitrogenadas (ácido citidílico y guanílico) promueven el crecimiento de cultivos de callo, usándose en una concentración de 100 mg/l

4.5.1.3. Material inerte de soporte.

El agar es el material de soporte más usado en el cultivo de tejido, pues provee el medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo. Sin embargo, fisiológicamente no es inerte, puesto que es una fuente de cantidades variables de sustancias inhibitoras o estimulante del crecimiento.

En el cultivo “in vitro” la mayor parte de los investigadores utilizan en la etapa de multiplicación, individualización y enrizamiento, medios semisólidos compuesto por diferentes concentraciones de agar (0,45-0,8%) o Gelrite (0,2-0,3%). Los medio líquido con agitación (100 rpm), ha sido reportado por Angarita y Perea (1991), Cronauer and Krikorian, (1985) para la siembra de ápices caulinares y flores de banano respectivamente.

4.6. AGENTES DESINFECTANTES.

Son muchos los productos utilizados para separar de las superficies vegetales el gran número de microorganismos, que pueden llegar a contaminar el medio de cultivo y ser una limitante para el éxito.

Como desinfectante de superficie el más usado comúnmente es el hipoclorito de sodio (NaOCl), el cual se consigue comercialmente como blanqueador y que contiene generalmente entre 5-6 % de hipoclorito de sodio. De igual forma el hipoclorito de calcio también se utiliza frecuentemente en la desinfección de materiales y su efectividad es

bastante buena. Sin embargo, en algunos cultivos este último ha llegado a causar toxicidad a los tejidos; algunos alcoholes etílicos e isopropílicos son también utilizados como desinfectantes de superficie y generalmente el tiempo de exposición de estos son menores que los de los hipocloritos.

Para el uso de todos los productos anteriormente mencionados es necesario realizar una calibración tanto de la concentración que será utilizada, como el tiempo durante el cual se expone al producto el material vegetal objeto de estudio.

Uno de los desinfectantes más utilizado para la desinfección de explante de plátano y banano es el hipoclorito de Sodio en sus diferentes presentaciones comerciales. Las concentraciones y tiempo de desinfección, varían con el tamaño del rizoma o explante que se está procesando (Jaramillo, 1993).

4.7. CONDICIONES AMBIENTALES DEL CULTIVO.

Los diferentes reportes indican que a una temperatura promedio de 27 °C, una intensidad luminosa de 3.000 lux y una humedad relativa de 70% son las condiciones ideales para producir plantas de bananos “*in vitro*” En general se ha observado que el banano no es exigente en la intensidad luminosa y cuando le da la luz directa del sol, o cuando las lámparas son de mayor potencia (120 w), se da un deterioro en la coloración de las plantas, quizás por la fotooxidación de la clorofila y un incremento en la tasa de respiración. Temperaturas superiores a los 33 °C. en los cuartos de crecimiento inciden significativamente en el comportamiento de crecimiento y desarrollo del material, por cuanto la temperatura interna dentro del recipiente es superior a la exterior por lo menos 2 °C. (Jaramillo, 1993).

5. METODOLOGÍA

5.1 LOCALIZACION DEL PROYECTO.

El trabajo se realizó en el laboratorio de cultivo de tejido vegetales de la Universidad de Sucre, sede principal Sincelejo (Sucre), su posición geográfica en el país es de 9° 18' latitud norte y 75° 23' longitud W. de Greenwich, con altitud de 212 metros sobre el nivel del mar; tiene clima benigno y agradable con 27° C. de temperatura media y pluviosidad media anual de 1580 milímetros.

5.2. PROCEDIMIENTO.

5.2.1. Selección de plantas madres.

El cultivo se estableció a partir de 36 yemas apicales caulinares extraídas de rizomas de *Musa balbisiana*, híbrido FHIA-21, proveniente de Corpoica (Córdoba). Estas plántulas se seleccionaron por sus características fenotípicas y genotípicas de la variedad. Estas plantas se encontraban sanas, vigorosas y resistente a la Sigatoca negra, como lo muestra la figura 1.



Figura 1. Aspecto visual de las plantas madres.

5.2.2. Extracción y desinfección de los explantes.

Para la desinfección y extracción de las yemas de rizomas, se utilizó el hipoclorito de sodio (NaOCl) como desinfectante.

Los rizomas se encontraban en bolsas negras, donde se sacaron y se lavaron con bastante agua corriente y cepillo para eliminar toda la tierra, se eliminaron tanto las hojas como las vainas foliares más viejas, procediéndose luego a lavar nuevamente éstas secciones, utilizando un cepillo y enjuagándose en agua corriente. Se efectuó a continuación un corte en cada uno de los tallos, en donde se dejó una sección a utilizar de 6.0 cm. (De la base donde se encuentra el ápice meristemático al extremo distal), (Figura 2). Con los segmentos obtenidos se realizaron las primeras desinfecciones, sumergiéndose completamente grupos de ápices meristemáticos en concentraciones de 1.5; 2.0 y 2.5 % de NaOCl, manteniéndose el tiempo de desinfección por 50 min. en el primer tratamiento. Transcurrido ese tiempo, los pasos siguientes se efectuaron bajo condiciones asépticas en la cámara de flujo laminar.

A cada segmento de tallo se le retiraron las cubiertas externas de las bases foliares y se efectuaron los cortes necesarios para obtener un segmento de 4.0 cm. de longitud, los cuales se sumergieron los mismos grupos de segmentos en las mismas concentraciones de NaOCl, por un tiempo de exposición de 30 min.; procediéndose nuevamente a retirar las cubiertas más externas de la base foliar hasta obtener un segmento de 3.0 cm. de longitud, sumergiéndose en la solución de NaOCl por un tiempo de 10 minutos. Realizada la tercera desinfección se efectuaron una serie de cortes, uno a cada lado del cuadrado dejándose éste de 0.5 cm. por 0.5 cm. de lado; se realizó un corte en la base dejándose 0.5 cm. de tejido sub-apical y 0.5 cm. de tejido foliar. El largo del segmento a sembrar fue de 1.0 cm. (Figura 3).

Una vez realizado los cortes hasta obtener el tamaño del ápice adecuado, éstos se enjuagaron en agua destilada para eliminar las sustancias tóxicas y se sembraron en los respectivos medios de iniciación.

La toma de datos se empezó a realizar cinco días después de la siembra y los datos se tabularon en los respectivos cuadros (Anexo 1)



Figura 2. Forma de los rizomas del híbrido FHIA-21, utilizado en la primera desinfección.



Figura 3. Tamaño del ápice meristemático utilizado para la siembra.

5.2.3. Siembra.

Una vez realizados los cortes necesarios para obtener el explante adecuado para cada ensayo, se procedieron a la siembra en un medio de cultivo preparado con sales MS, los

cuales estaban depositados en los respectivos frascos. Los frascos y los medios de cultivos se esterilizaron antes de su utilización.

5.2.4. Etapa de establecimiento del cultivo.

Los ápices meristemáticos aptos para la siembra se depositaron con la base introducida en el medio nutritivo MS y las yemas hacia arriba; Cada frasco se selló con una capa de papel aluminio y una capa de papel vinilpex en condiciones de esterilidad (cámara de flujo). Estos explantes permanecieron en estos medios por un periodo de más de un mes, tiempo en el cual se hicieron las primeras tomas y tabulación de los datos en las respectivas cuadro (Anexo 1)

Las condiciones ambientales en los cuartos del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales fueron las siguientes: Temperatura de 27 más o menos 2 °C., humedad relativa del 70% e intensidad lumínica de 1500 lux proporcionadas por lámparas fluorescentes de 20 W., suministrándose 16 horas luz.

5.2.5. Etapa de multiplicación.

Los ápices meristemáticos que se encontraban creciendo en los medios de iniciación, se le realizó un corte en cruz para obtener cuatro segmentos iguales como se observa en la figura 4. En condiciones de esterilidad cada uno de los segmentos obtenidos, se colocaron en los respectivos frascos que contenían medio de cultivo para multiplicación, se sellaron los frascos con una capa de papel aluminio y una capa de papel vinilpex, y se colocaron en el cuarto de crecimiento del Laboratorio.



Figura 4. Ápice meristemático dividido en cuatro segmentos iguales para la siembra en los medios de multiplicación.

Por un periodo de más de cuatro meses, se hicieron transferencias de los explantes en medio fresco cada 21 días para garantizarles a los segmentos de ápice del híbrido FHIA-21, una provisión completa y remover los compuestos que inducen a la fenolización del medio, los cuales son tóxicos y / o retardadores del crecimiento; durante ese tiempo se hicieron los primeros registros de las medidas de crecimiento y desarrollo de los brotes del FHIA-21 y se tabularon en los respectivos cuadros (Anexo 2)

5.2.6. Etapa de enraizamiento de las plántulas.

Cuando los brotes presentaron un desarrollo filiar de 2 a 3 hojas y una longitud del pseudo tallo de alrededor de tres centímetros, en la cámara de flujo laminar se realizó la individualización de las plántulas, las cuales se sembraron una planta por recipiente en los respectivos medios de enraizamiento. En esta etapa los frascos se cubrieron con una capa de papel aluminio y una capa de papel vinilpex y se colocaron en el cuarto de crecimiento por un periodo de un mes, tiempo en el cual se tomaron los primeros datos y se tabularon en los respectivos cuadros (Anexo 2).

5.3. VARIABLES E INDICADORES.

Para desarrollar este trabajo se hizo necesario dividirlo en varias etapas.

- **Etapas de desinfección de los explantes.**

Cuadro 2. Variables e indicadores para la etapa de desinfección de los explantes.

Variables independientes	Variables dependientes	Indicadores
Hipoclorito de Sodio	% Supervivencia	Nº rizomas vivos.
	% Contaminación	Nº rizomas contaminados
	% Mortalidad	Nº Rizomas quemados

- **Etapas de establecimiento del cultivo “in vitro”.**

Cuadro 3. Variables e indicadores para la etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”.

Variables independientes	Variables dependientes	Indicadores
Concentración de agar	% Supervivencia	Nº Explantes vivos
	% Mortalidad	Nº Explantes muertos

- **Etapas de multiplicación del material establecido “in vitro”.**

Cuadro 4. Variables e indicadores para la etapa de multiplicación.

Variables independientes	Variables dependientes	Indicadores
Concentración de BAP	% Supervivencia	Nº de brotes
Concentración de agar	% Mortalidad	Nº de hojas

- **Etapa de enraizamiento de las plántulas “in vitro”.**

Cuadro 5. Variables e indicadores para la etapa de enraizamiento.

Variables independientes	Variables dependientes	Indicadores
Concentración de agar	% Supervivencia	N° de raíces.
Concentración de ANA	% Mortalidad	

5.3.1. Manejo de Variables.

- **Etapa de desinfección de los explantes.**

Cuadro 6. Manejo de variables para la etapa de desinfección de los explantes.

Concentración NaOCl (%)
1.5
2.0
2.5

- **Etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”.**

Cuadro 7. Manejo de variables para la etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”.

Concentración de Agar (%)
0
0.3
0.6
0.9

- **Etapa de multiplicación del material establecido “in vitro”.**

Cuadro 8. Manejo de variables para la etapa de multiplicación.

Concentración de BAP (mg/l)	Concentración de agar (%)
0	0
1	
5	
10	
0	0.3
1	
5	
10	
0	0.6
1	
5	
10	
0	0.9
1	
5	
10	

- **Etapa de enraizamiento de las plántulas “in vitro”.**

Cuadro 9. Manejo de variables para la etapa de enraizamiento.

Concentración de ANA (mg /l)	Concentración de Agar (%)
0	0
0.5	
1	
0	0.3
0.5	
1	
0	0.6
0.5	
1	
0	0.9
0.5	
1	

5.4. DISEÑO ESTADÍSTICO.

Los diseños estadísticos que se utilizaron para éste trabajo de investigación, fueron: el diseño completamente al azar (para la etapa de desinfección e iniciación) y el diseño de bloques al azar (para la etapa de multiplicación y enraizamiento), en la cual, cada unidad experimental se ordenó dependiendo de la complejidad de cada una de las etapas que componen esta experimento. Se utilizó el estadístico ‘F’ para el análisis de varianzas y se aplicó la Prueba de Rango Múltiple Duncan. (Vera, 1987).

5.4.1. Distribución de los tratamientos en los estantes.

- **Etapa de desinfección de los explantes.**

En esta etapa se desarrollaron tres tratamientos con doce repeticiones cada uno de ellos, distribuido al azar en los entrepaños como lo muestra el cuadro 10.

Tratamientos	Concentración de NaOCl (%)
A	1.5
B	2.0
C	2.5

Cuadro 10. Distribución completamente al azar de los tratamientos de la etapa de desinfección en los entrepaños del estantes.

Entrepaño N° 1

A	C	B	B	A	C	A	B	C
C	B	A	B	C	A	B	C	A
B	A	C	A	B	C	A	C	B
C	A	B	C	A	B	C	B	A

- **Etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”.**

Para esta etapa se trabajó con cuatro tratamientos, dispuesto al azar en el entrepaño. Cada tratamiento constaba de ocho repeticiones, distribuidos de la forma como se observa en el cuadro 11.

Tratamientos	Concentración de agar (gr./l)
A	0
B	3
C	6
D	9

Cuadro 11. Distribución completamente al azar de los tratamientos de la etapa de establecimiento del cultivo “in vitro” en los entrepaños del estantes.

Entrepaño N° 1

A	C	D	B	D	C	A	B
C	A	B	D	A	D	B	C
D	B	A	C	C	B	D	A
B	D	C	A	B	A	C	D

- **Etapa de multiplicación de los explantes.**

Para desarrollar esta fase, las unidades experimentales se dispusieron en bloques al azar. Se trabajó con 16 tratamientos con 4 repeticiones cada uno, formándose 4 bloques, 2 en cada entrepaño, dispuesta cada tratamiento como se observa en el cuadro 12.

Tratamientos	Concentraciones (agar (gr/l)/BAP (mg/l))	Tratamientos	Concentraciones (agar (gr/l)/BAP (mg/l))
A	(0/0)	I	(6/0)
B	(0/1)	J	(6/1)
C	(0/5)	K	(6/5)
D	(0/10)	L	(6/10)
E	(3/0)	LI	(9/0)
F	(3/1)	M	(9/1)
G	(3/5)	N	(9/5)
H	(3/10)	Ñ	(9/10)

Cuadro 12. Distribución de los tratamientos en bloques al azar de la etapa de multiplicación del cultivo “in vitro” en los entrepaños del estantes.

Bloque I	A	F	K	C	I	Ñ	L	B
	J	D	N	H	LI	E	G	M
Bloque II	Ñ	B	I	L	H	A	F	LI
	M	E	J	D	N	K	C	G
Bloque III	H	A	E	D	Ñ	C	K	N
	LI	J	L	B	I	M	G	F
Bloque IV	B	Ñ	G	F	J	D	E	K
	LI	I	Ñ	M	A	L	H	C

- **Etapas de enraizamiento de las plántulas**

Para esta etapa se desarrollaron 12 tratamientos, distribuidos en bloques al azar. Cada tratamiento constó de 5 repeticiones, distribuido en los entrepaños como lo muestra el cuadro 13.

Tratamientos	Concentraciones (agar (gr/l)/ ANA (mg/l))	Tratamientos	Concentraciones (agar (gr/l)/ ANA (mg/l))
A	(0/0)	G	(6/0)
B	(0/0,5)	H	(6/0,5)
C	(0/1)	I	(6/1)
D	(3/0)	J	(9/0)
E	(3/0,5)	K	(9/0,5)
F	(3/1)	L	(9/1)

Cuadro 13. Distribución de los tratamientos en bloques al azar de la etapa de enraizamiento de las plántulas los entrepaños del estantes.

Bloque I			Bloque II			Bloque III		
A	F	C	D	E	G	L	J	I
I	K	J	H	F	B	G	C	D
L	B	E	C	I	K	A	F	H
G	H	D	J	A	L	E	B	K

Bloque IV

Bloque V

H	B	K	C	F	D
E	L	A	K	G	B
G	D	J	I	E	L
C	I	F	A	J	H

6. RESULTADOS

6.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES.

La concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl), más indicada para la desinfección de los explantes en el cultivo “*in vitro*” de *Musa balbisiana*, híbrido FHIA-21, fue la del tratamiento B (2% NaOCl), donde se observó mayor número de explantes vivos, como lo muestran los resultados obtenidos en la evaluación final correspondiente a la etapa de desinfección (cuadro 14, figura 5).

La aparición de microorganismos contaminantes (hongos y bacterias), se observó a los cinco días después de la siembra, principalmente en el tratamiento A, en donde los ápices fueron desinfectados con NaOCl al 1.5%, al mismo tiempo se observó en el tratamiento C (2.5% NaOCl) los primeros ápices quemados debido a la acción del desinfectante.

La figura 5 muestra los porcentajes de supervivencia, mortalidad y contaminación de los explantes como también las concentraciones de NaOCl utilizada en los diferentes tratamientos. En esta figura se observa que el tratamiento B (2.0% NaOCl), presenta el mayor porcentaje de supervivencia de los explantes con un 95,83% y el menor porcentaje de contaminación (4.16%), seguido de los tratamientos C (2.5% NaOCl) y A (1.5% NaOCl) con 83.33% y 45.83% de supervivencia respectivamente. Además se puede apreciar que al ir aumentando la concentración de NaOCl, también va aumentando el porcentaje de supervivencia de los explantes, hasta llegar a un punto donde se alcanza el máximo porcentaje de supervivencia (2.0% NaOCl); hasta este punto la concentración del desinfectante y el porcentaje de supervivencia son variables directamente proporcionales. Si las concentraciones de NaOCl son mayores al 2.0%, el porcentaje de supervivencia disminuyen a medida que aumenta las concentraciones de NaOCl, convirtiéndose estas en variables inversamente proporcionales.

Cuadro 14. Resultado final de la etapa de desinfección de los explantes, utilizando diferentes concentraciones de NaOCl.

Trat.	% NaOCl	Nº explantes tratados	Nº explantes Vivos	% Supervivencia	Nº explantes contaminados	% Contaminación	Nº explantes muertos	% Mortalidad
A	1.5	12	5.5	45.83	6.5	54.17	0.0	0.0
B	2.0	12	11.5	95.83	0.5	4.16	0.0	0.0
C	2.5	12	10	83.33	0.0	0.0	2.0	16.66

Nota: Valores promedio de dos replicas, se encuentran en el anexo 3.

Los resultados obtenidos en esta fase se sometieron a un análisis de varianza, encontrándose que existen diferencias estadísticas altamente significativas entre los tratamientos ($\alpha=1$ y 5%, anexo 4). Para determinar las diferencias y similitudes entre los tratamientos en el porcentaje de supervivencia de los explantes se les aplicó la prueba de Rango Múltiple de Duncan, encontrándose que los tratamientos B y C son significativamente iguales entre sí, pero estadísticamente diferente al tratamiento A ($\alpha=1$ y 5%, anexo 5).

En la etapa de desinfección de los explantes del híbrido FHIA-21, se encontró también que el tratamiento A (1.5% NaOCl) mostró el mayor porcentaje de explantes contaminados con un 54.17% por hongos y/o bacterias, seguido del tratamiento B con un 4.16%; Mientras que en el tratamiento C (2.5% NaOCl) no se observó ningún tipo de contaminación (cuadro 14 y figura 5). La figura 5 muestra que las concentraciones de NaOCl y el porcentaje de explantes contaminados con variables inversamente proporcionales.

El análisis de varianza aplicada a los explantes contaminados muestra que hay diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados ($\alpha=1$ y 5%, anexo 6). La Prueba de Duncan muestra que el tratamiento A es estadísticamente diferente a los tratamientos B y C, mientras que estos últimos son significativamente iguales entre sí (anexo 7).

Los ápices meristemáticos del híbrido FHIA-21, que se encontraban en el tratamiento C tuvieron un 16.6% de mortalidad; en cambio que en los tratamientos A y B no se observó mortalidad de los explantes (cuadro 12 y figura 5). En la figura 5 se observa una fase donde no se presenta mortalidad, la cual va desde una concentración de NaOCl de 1.5 a 2.0%; A concentraciones superiores al 2.0%, los explantes empieza a decaer y a morir, presentándose en este caso una relación directamente proporcional entre el porcentaje de mortalidad y las concentraciones del desinfectante.

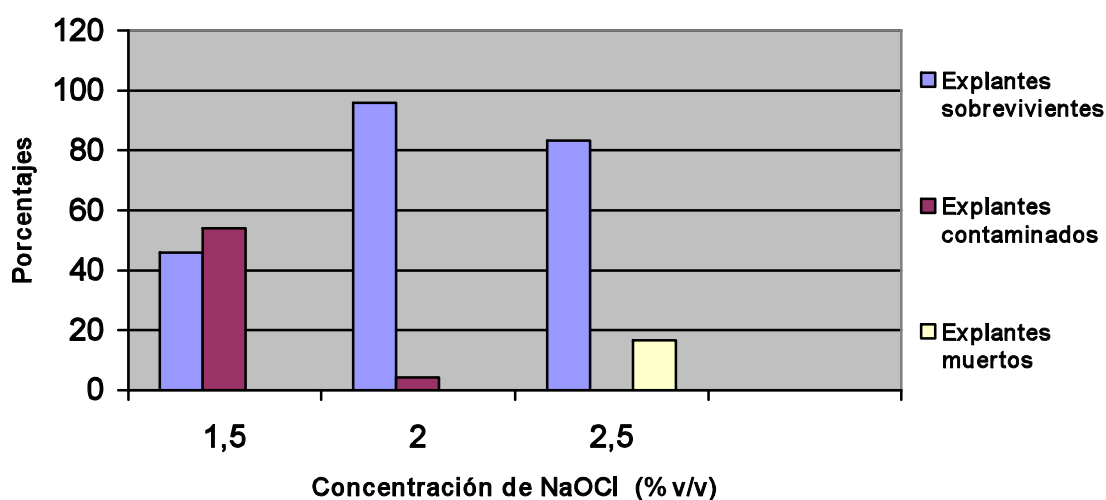


Figura 5. Porcentajes de supervivencia, contaminación y mortalidad de los explantes en diferentes concentraciones de NaOCl, durante la etapa de desinfección.

El análisis de varianza aplicado al número de explantes muertos muestra que a nivel de los tratamientos existe diferencias altamente significativa ($\alpha=1$ y 5%, anexo 8): La Prueba de Rango Múltiple de Duncan indica que el tratamiento C es significativamente diferente a los tratamientos A y B; pero estos son estadísticamente iguales entre sí. (anexo 9).

6.2. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO “IN VITRO”.

Una vez estandarizada la etapa de desinfección de los explantes, los ápices meristemáticos que no fueron descartados por muerte o contaminación, se sembraron en los diferentes medios de iniciación y se les hizo cambio de medios fresco cada 15 días por un periodo de un mes y medio.

Los medios de cultivos compuesto por los tratamientos B (0.3% agar) y C (0.6% agar), permitieron un buen desarrollo y supervivencia de los ápices meristemáticos de *Musa balbisiana*, híbrido FHIA-21, como se observa en la cuadro 15 y figura 6; ya que la

proliferación y el crecimiento de los brotes tuvo una apariencia vigorosa en estos medio de cultivos. En estos tratamientos se observó que los ápices meristemáticos tomaban una coloración verdosa y se engrosaban en el área foliar.

En los tratamientos A (0% agar) y D (0.9% agar), el crecimiento y desarrollo de los ápices meristemáticos, fue lento, presentándose en estos el mayor número de explantes muertos por efecto de la consistencia del medio de cultivo. Mientras que los tratamientos B y C compuesto por medio básico MS y gelificados con 0.3 y 0.6% de agar, presentaron el mayor porcentaje de explantes vivos, ambos con un 93.75%; y el menor porcentaje de mortalidad con un 6.25% (cuadro 15 y figura 6). Los tratamientos D y A compuesto por el mismo medio básico pero gelificados con 0.9 y 0% de agar presentaron un 56.25 y 31.25% de supervivencia y un 43.75 y 68.75% de mortalidad de los explantes respectivamente

Cuadro 15. Resultados de la evaluación final en la etapa de iniciación, utilizando medio básico MS con diferentes concentraciones de agar.

Trat.	% Agar	N° explantes tratados	N° explantes vivos	% Supervivencia	N° explantes muertos	% Mortalidad
A	0	8	2.5	31.25	5.5	68.75
B	0.3	8	7.5	93.75	0.5	6.25
C	0.6	8	7.5	93.75	0.5	6.25
D	0.9	8	4.5	56.25	3.5	43.75

Nota: Valores promedios de dos replicas se encuentran en el anexo I.

La figura 6 muestra los porcentajes de supervivencia y mortalidad de los ápices meristemáticos, sembrados en medio MS con diferentes concentraciones de agar.

En estos ensayos la respuesta de la mayoría de los ápices fue positiva, debido a las relaciones observadas entre las concentraciones de agar en los medios de cultivo y los porcentajes de supervivencia y mortalidad de los explantes. En la figura 6 puede observarse de que si partimos de una concentración 0% de agar hasta una concentración de 0.3%, el porcentaje de explantes vivos aumenta de 31.25 a 93.75% en el rango de estas concentraciones se observa una relación directamente proporcional entre estas dos variables, mientras que el porcentaje de mortalidad empieza a disminuir proporcionalmente en este intervalo de 68.75 a 6.25% dándose en este caso una relación inversa. El máximo porcentaje de supervivencia como el mínimo porcentaje de mortalidad se da entre las concentraciones de 0.3 a 0.6% de agar; en estas concentraciones de agar el porcentaje de supervivencia y mortalidad se mantiene constante. A concentraciones de agar superiores al 0.6%, el porcentaje de explantes vivos comienza a disminuir de 93.75 a 56.25%, dándose en este caso una relación inversamente proporcional entre estas variables; en cambio el porcentaje de mortalidad aumenta proporcionalmente de 6.25 a 43.75% a medida que aumenta la concentración de agar, presentándose una relación directamente proporcional entre las variables.

El análisis de varianza aplicado al número de los explantes vivos en la etapa de establecimiento del cultivo "in vitro", muestra estadísticamente las similitudes y diferencias existen entre los tratamientos ($\alpha=1$ y 5%, anexo 11). La prueba de Duncan muestra que los tratamientos B-C y A-D es estadísticamente iguales entre sí. Las diferencias significativas se dan entre los tratamientos B y C con los tratamientos A y D. ($\alpha=1$ y 5%, anexo 12). Igualmente existen diferencias y similitudes en el porcentaje de mortalidad entre los tratamientos como puede observarse en los anexos 13 y 14.

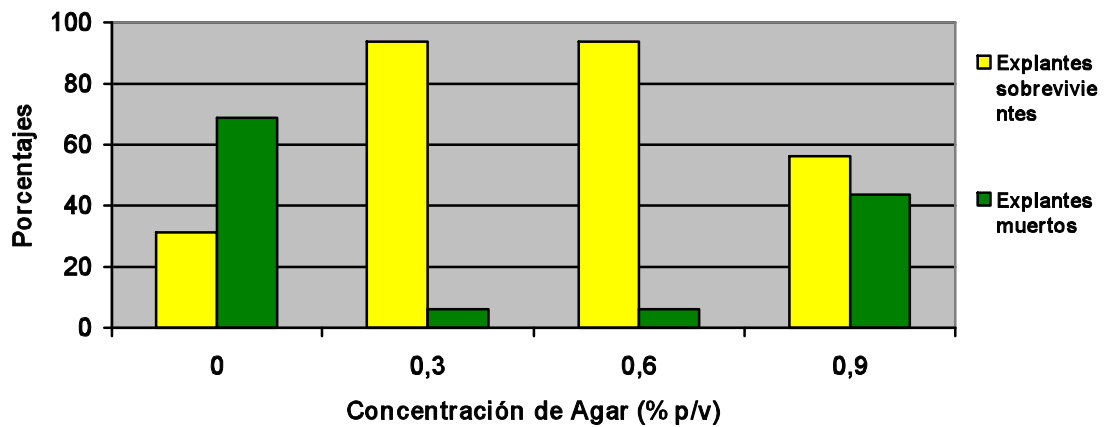


Figura 6. Porcentaje de supervivencia y mortalidad de los explantes del Híbrido FHIA-21, en diferentes concentraciones de agar.

6.3. ETAPA DE MULTIPLICACIÓN DE LOS BROTES.

En los estantes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, se encuentra algunas de las plántulas del híbrido FHIA-21 en al proceso de desarrollo y multiplicación, como puede observarse en la figura 7.



Figura 7. Ubicación de las plántulas del híbrido FHIA-21 en el cuarto de crecimiento.

En esta etapa no todos los tratamientos respondieron de la misma manera, diferenciándose al nivel de la producción de brotes, tasa de crecimiento y número de hojas.

A los explantes que se les realizaron cortes en cruz para obtener cuatro segmentos iguales en el medio de multiplicación (figura 4), se observó que la producción de brotes de estos se daba a un costado de los segmentos de los explantes. La eliminación de la dominancia apical de los rizomas aumenta la brotación en algunos de los tratamientos evaluados en esta etapa.

6.3.1. Producción de brotes.

El tratamiento que produjo la mayor cantidad de brotes hasta la sexta división fue K con 2543.8, seguido de los tratamientos M y J con 1319.6 y 1044.1 respectivamente. En estos tratamientos se observa la mayor cantidad de brotes como puede observarse en el cuadro 16 y figura 13. El promedio de brotes producidos hasta la sexta división por cada segmento de ápice meristemático fue de 643.08 en el tratamiento K, 324.27 en el tratamiento M y 225.92 en el tratamiento J (cuadro 16 y figura 13). La producción y desarrollo de los brotes a los 63 días después de la siembra correspondiente al tratamiento K, compuesto por medio MS, 5 mg/l de BAP y gelificado con 0.6% de agar, puede observarse en la figura 8. En este tratamiento puede apreciarse que los brotes son verdes y con una buena apariencia, diferenciándose entre sí uno de otros.



Figura 8. Apariencia de los brotes desarrollados en el tratamiento K, a los 63 días después de la siembra en la etapa de multiplicación.

Cuadro 16. Producción de brotes por tratamiento en cada una de las divisiones de la multiplicación "in vitro" de *Musa balbisiana*, híbrido FHIA-21.

Div.	T R A T A M I E N T O S														Prom.		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	LL	M		N	Ñ
1-2	0	0	0	0	2.50	1.25	1.75	0.75	2.50	2.75	2.75	2.50	2.00	4.25	2.50	2.25	1.734
2-3	0	0	0	0	3.75	4.375	3.937	1.312	5.625	12.37	15.81	8.125	4.50	17.0	8.125	6.187	5.694
3-4	0	0	0	0	4.687	17.5	9.843	1.64	8.43	46.40	102.78	14.21	11.25	51.0	22.34	17.0	19.19
4-5	0	0	0	0	9.375	48.12	19.68	3.28	16.87	174	565.29	49.76	45.0	229.5	134.0	72.31	85.45
5-6	0	0	0	0	16.4	132.3	39.37	5.74	63.28	1044.1	2543.8	161.7	157.5	1319.6	435.7	289.2	388.04
Prom.	0	0	0	0	7.34	40.71	14.91	2.544	19.34	225.92	646.08	47.259	44.05	324.27	120.5	77.38	

Nota: Cada una de las divisiones de los explantes se realiza cada 21 días.

En los tratamientos líquidos A, B, C y D los explantes quedaron totalmente sumergidos en los medios de cultivos. En ninguno de estos medios los explantes sobrevivieron como se puede observar en la figura 9.

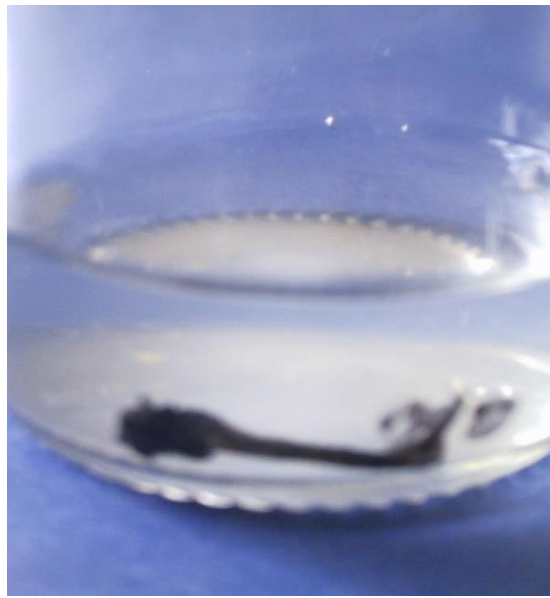


Figura 9. Aspecto de las explantes sembrados en los medios líquidos durante la etapa de multiplicación.

Los explantes sembrados en los tratamientos semilíquidos, gelificados con 0.3 % de agar y con diferentes concentraciones de BAP, quedaron parcialmente sumergidos en estos medios de cultivos, presentándose en algunos de ellos un leve crecimiento y desarrollo de brotes como en los tratamientos F y G. La apariencia que toman estos brotes es el de una masa de células en forma de roseta, donde abundan hojas pequeñas que por lo general se desarrollan en cualquier punto de la masa; estos brotes son pequeños y no se diferencian en su totalidad como puede observarse en la figura 10.

La producción promedio de brotes en los diferentes medios de cultivos semilíquidos fue de 2.54, 7.34, 14.91 y 40.71 correspondiente a los tratamientos H, E, G y F (cuadro 16 y figura 13).

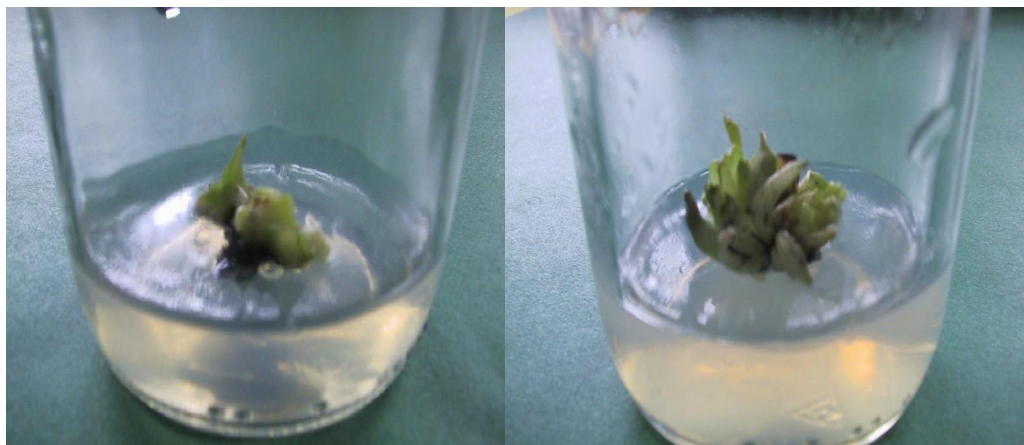
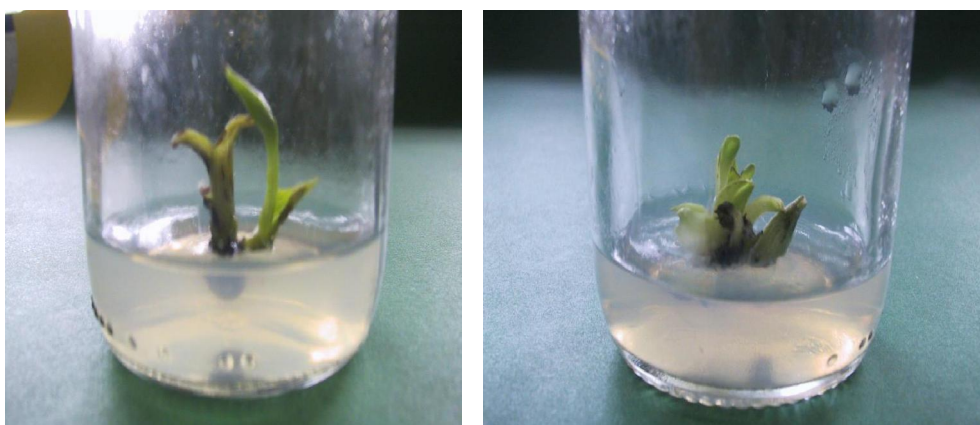


Figura 10. Explantes en forma de roseta desarrollados en medios semilíquidos, correspondiente a los tratamientos E, F, G y H, durante la etapa de multiplicación.

Los medios de cultivo sólidos compuestos por 0.9% de agar y 0, 1, 5 y 10 mg/l de BAP, correspondiente a los tratamientos Ll, M, N y Ñ, la producción promedio de brotes en cada uno de ellos fue de 44.05, 324.27, 120.53 y 77.39 por tratamiento. Los brotes en estos medios son gruesos y verdes principalmente en el tratamiento M y N, diferenciándose uno de otros como se puede apreciar en la figura 11.



a- Tratamiento M

b- Tratamiento N

Figura 11. Apariencia de los brotes en los tratamientos M y N, durante la etapa de multiplicación.

Los explantes sembrados en medios de cultivo gelificados con 0.3, 0.6 y 0.9 de agar, pero sin reguladores de crecimiento BAP, mostraron raíces en cada una de las divisiones desarrolladas en esta etapa; el número y longitud de las raíces dependen básicamente de la consistencia del medio. Entre menos este gelificado el medio de cultivo mayor será el número de las raíces de los explantes, pero si el medio está muy gelificado las raíces serán pocas pero gruesas como puede observarse en la figura 12.



a- Medio de cultivo semisólido

b- Medio de cultivo sólido

Figura 12. Desarrollo de raíces en medios de cultivos gelificados con agar pero sin BAP, durante la etapa de multiplicación.

La figura 13 muestra las relaciones que se dan entre la producción de brotes y las diferentes concentraciones de agar y el regulador de crecimiento BAP

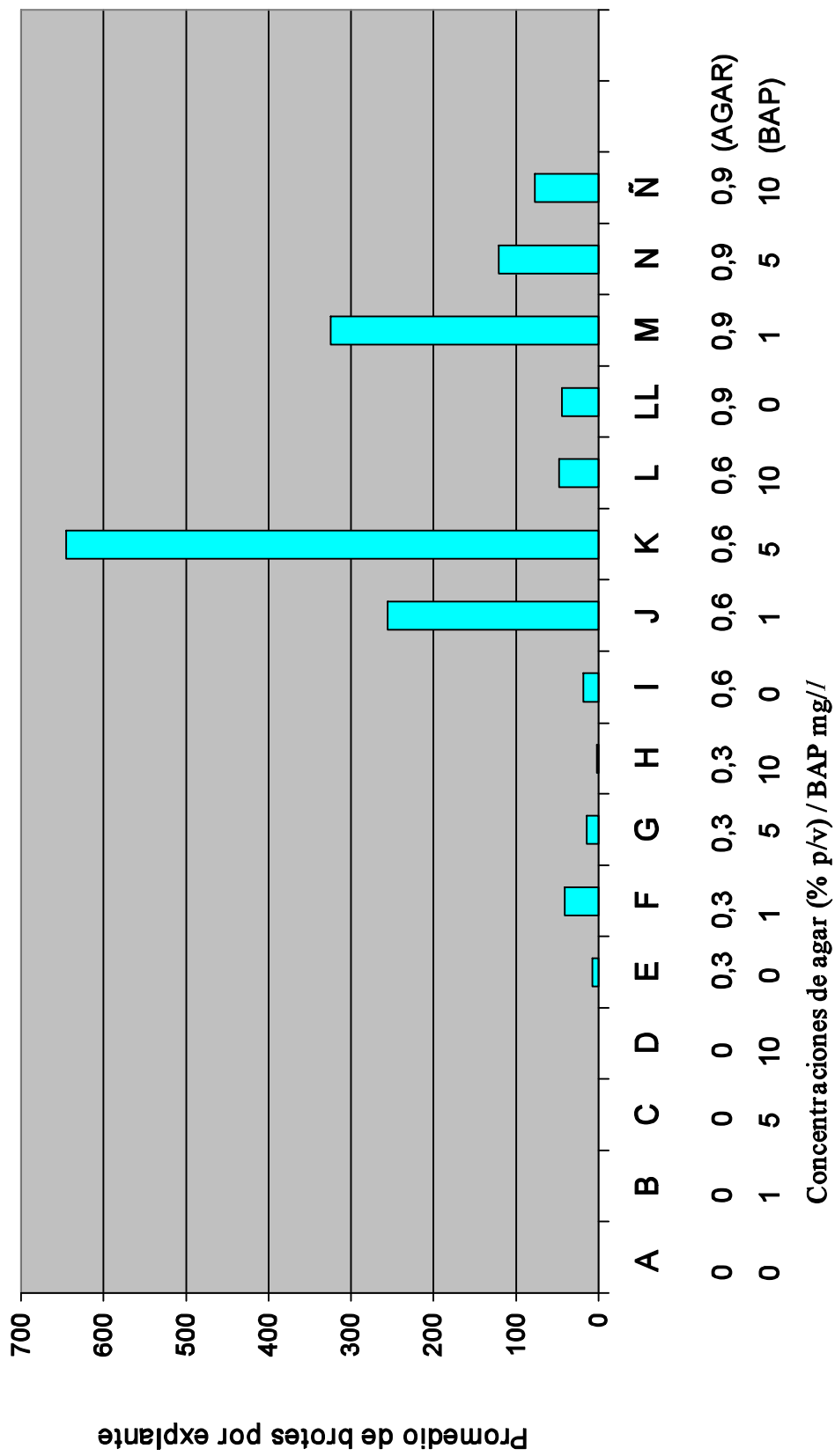


Figura 13. Producción de brotes promedios del híbrido FHIA-21, en diferentes concentraciones de agar y BAP durante la etapa de multiplicación.

Esta figura muestra que en los medio de cultivos gelificados con 0.3 y 0.9 % de agar la mayor producción de brote se obtuvo utilizando una concentración de BAP de 1 mg/l seguido de la concentración de 5 mg/l; caso contrario se da con una concentración de 0.6% de agar donde la mayor producción de brotes se da utilizando 5 mg/l de BAP seguido de 1 mg/l. En cada una de las concentraciones de agar donde se produjo menor cantidad de brote, fue cuando se utilizó 10 mg/l de BAP (cuadro 16 y figura 13).

El número de brotes obtenidos en cada tratamiento se sometió a un análisis de varianza, mostrando la no existencia de diferencia significativas entre los tratamientos ($\alpha=1$ y 5%, anexo 15), pero existiendo diferencias a nivel de las divisiones realizadas a los explantes en esta etapa ($\alpha= 1$ y 5%, anexo 15). La prueba de rango múltiple de Duncan muestra que la sexta división es significativamente diferente al resta de las divisiones; pero estas últimas son estadísticamente iguales entre sí ($\alpha= 1$ y 5%, anexo 16).

6.3.2. Tasa de multiplicación de los brotes.

La tasa de multiplicación promedio más alta hasta la sexta división fue la del tratamiento K con 5, seguido de los tratamientos M y J con 4.3 y 4.15 respectivamente. El promedio de la tasa de multiplicación de los demás tratamientos puede observarse en el cuadro 17 y figura 16. La tasa de multiplicación de los explantes se obtiene relacionando el número de subunidades producidas en cada una de las divisiones correspondiente a cada tratamiento.

La tasa de multiplicación en cada una de las divisiones de los tres mejores tratamientos, se puede ver reflejada en la figura 14 y 15. En esta figura se observa que el tratamiento K en la tercera división tiene una tasa de multiplicación de 6.5, seguido de los tratamientos M y J donde la tasa más altas de estos tratamientos se encuentra en la sexta división con 5.75 y 6.0 respectivamente.

Cuadro 17. Tasa de multiplicación promedio de los explantes hasta la sexta división en la micropropagación del híbrido FHIA-21.

Div.	T R A T A M I E N T O S														Ñ	Prom.	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	LL	M			N
1-2	0	0	0	0	2.50	1.25	1.75	0.75	2.50	2.75	2.75	2.50	2.00	4.25	2.50	2.25	1.73
2-3	0	0	0	0	1.50	3.50	2.25	1.75	2.25	4.50	5.75	3.25	2.25	4.00	3.25	2.75	2.31
3-4	0	0	0	0	1.25	4.00	2.50	1.25	1.50	3.75	6.50	1.75	2.50	3.00	2.75	2.75	2.09
4-5	0	0	0	0	2.00	2.75	2.00	2.00	2.00	3.75	5.50	3.50	4.00	4.50	6.00	4.25	2.64
5-6	0	0	0	0	1.75	2.25	2.00	1.75	3.75	6.00	4.50	3.25	3.50	5.75	3.25	4.00	2.60
Prom.	0	0	0	0	1.80	2.75	2.10	1.50	2.40	4.15	5.00	2.85	2.85	4.30	3.55	3.20	

Nota: Cada una de las divisiones de los explantes se realiza cada 21 días

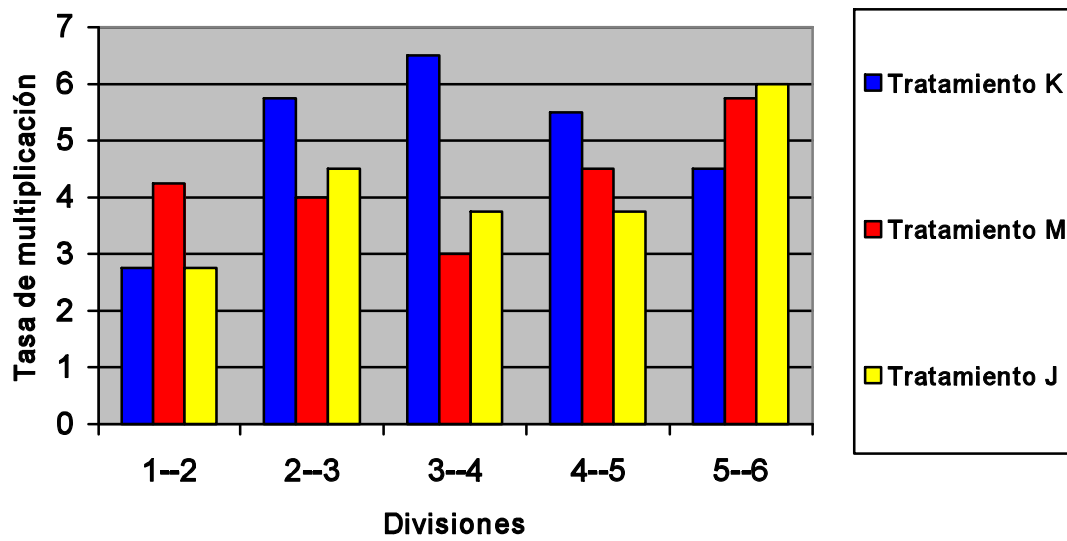
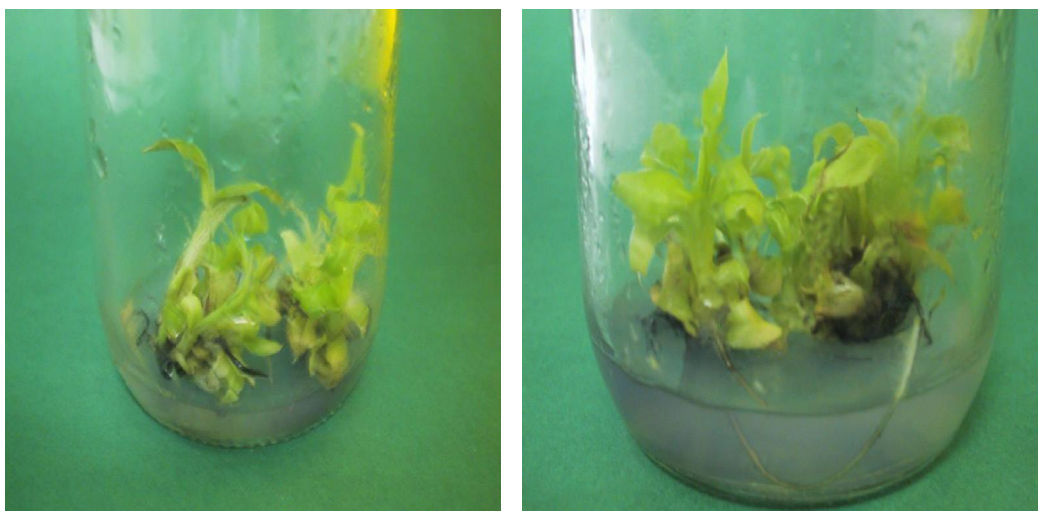


Figura 14. Tasa de multiplicación de los tratamientos K, M y J hasta la sexta división.



a- Tratamiento K



b- Tratamiento M

c- Tratamiento J

Figura 15. Aspecto visual de la tasa de multiplicación correspondiente a los tratamientos K, M y J.

La relación que se da entre la tasa de multiplicación promedio de los explantes con las diferentes concentraciones de agar y el regulador de crecimiento BAP, se puede apreciar en la figura 16. En esta figura se observa que en los tratamientos líquidos no hay desarrollo de brotes, mientras que en los tratamientos semilíquidos, semisólidos y sólidos los tratamientos que mejor respondieron en cada uno de estos medios de cultivos fueron el F, K y M respectivamente. De todos los tratamientos utilizados en esta etapa el que mejor respondió fue el medio de cultivo compuesto por sales MS, 5 mg/l BAP y gelificado con 0.6% de agar (Tratamiento K)(figura 15(a) y 16).

El análisis de varianza aplicado a los resultados de la tasa de multiplicación, muestra la existencia de diferencias entre los tratamientos y las divisiones en la etapa de multiplicación ($\alpha = 1$ y 5%, anexo 17). La Prueba de Rango Múltiple de Duncan muestra que el tratamiento K es significativamente igual a los tratamientos M y J y estos dos últimos son iguales al tratamiento N; Al nivel de las divisiones desarrolladas en esta etapa, la sexta división es estadísticamente igual a la tercera y quinta división, pero la quinta y sexta división son diferente al resto de las divisiones. Las demás diferencias y semejanzas entre los tratamientos y divisiones se pueden observar en el anexo 18.

6.3.3. Número de hojas por explantes.

En el cuadro 18 se observa los tratamientos que dieron en la sexta división, antes de la individualización los mejores resultados en el número de hojas por explantes. Como se aprecia el tratamiento N produjo en promedio 4.5 hojas por explantes, seguido de los tratamientos K, F y Ll con 3.25 hojas en promedio. Las hojas de los explantes que se encuentran en el tratamiento F son pequeñas y algunas de ellas se encuentran encrespadas; mientras que en los tratamientos N y K las hojas muestran un aspecto vigoroso.

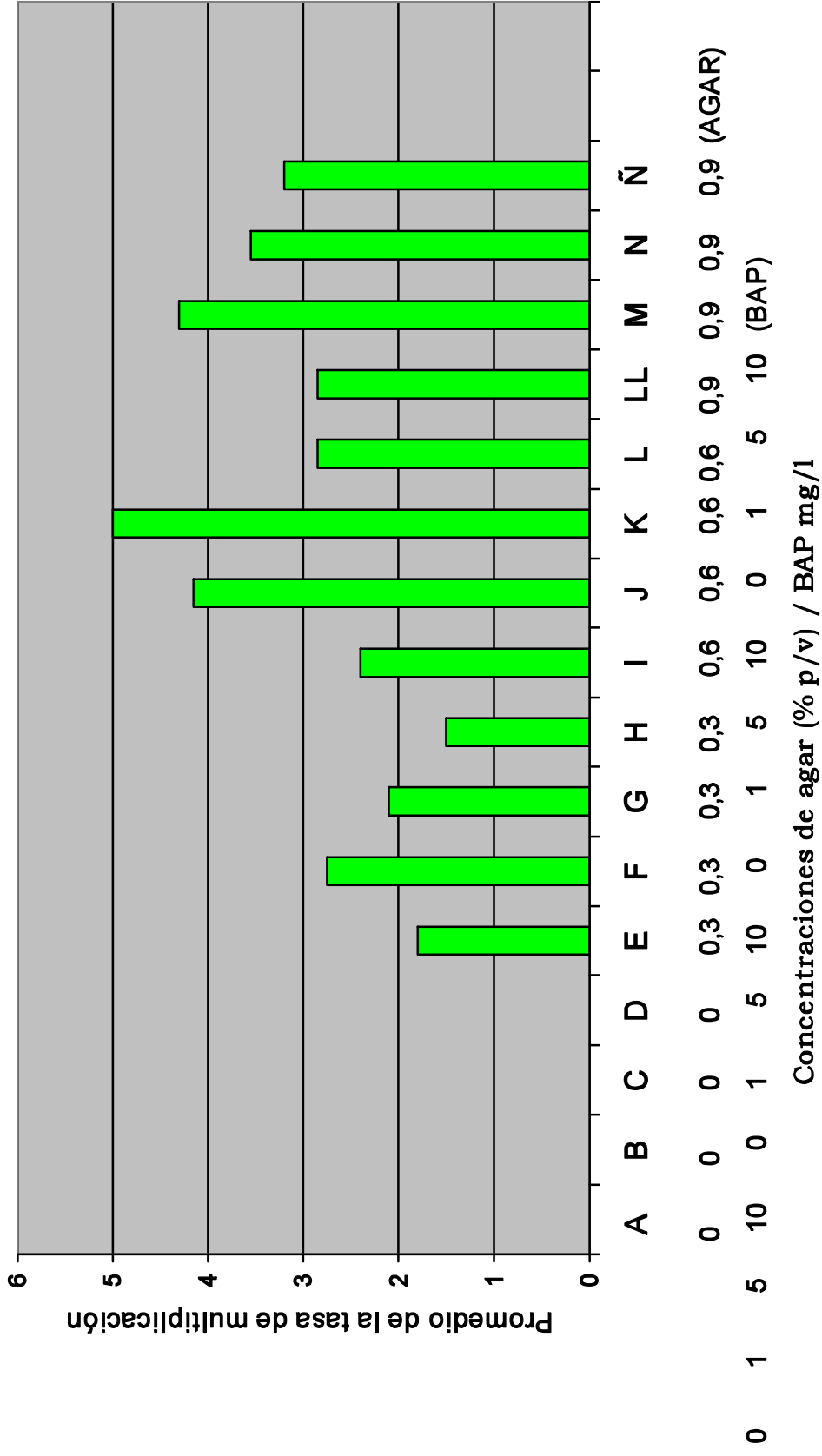


Figura 16. Tasa de multiplicación promedio de cada uno de los tratamientos en la etapa de multiplicación.

Cuadro 18. Promedio en el número de hojas a los 126 días después de la siembra (sexta división), durante la multiplicación del híbrido FHIA-21.

Repet.	T R A T A M I E N T O S															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	LL	M	N	Ñ
I	0	0	0	0	1.0	5.0	2.0	1.0	1.0	2.0	4.0	2.0	4.0	2.0	6.0	2.0
II	0	0	0	0	0.0	0.0	3.0	1.0	1.0	2.0	3.0	3.0	2.0	3.0	5.0	2.0
III	0	0	0	0	2.0	5.0	1.0	3.0	1.0	3.0	2.0	2.0	2.0	3.0	3.0	2.0
IV	0	0	0	0	2.0	3.0	2.0	2.0	3.0	2.0	4.0	2.0	5.0	2.0	4.0	2.0
Prom.	0	0	0	0	1.25	3.25	2.0	1.75	1.5	2.25	3.25	2.25	3.25	2.5	4.5	2.0

En la figura 17 se observa el aspecto que tienen las hojas de los explantes correspondiente a los tratamientos N y K ante de la individualización en la sexta división, las cuales son las plantas más vigorosas en esta etapa.



Figura 17. Aspecto visual de la cantidad de hojas del híbrido FHIA-21, en los tratamientos N y K, durante la etapa de multiplicación.

El análisis de varianza aplicado al número de hojas, muestra las diferencias existentes a nivel de los tratamientos ($\alpha = 1$ y 5%, anexo 19). La Prueba de Rango Múltiple muestra que los tratamientos N, Ll, F y K son significativamente iguales entre sí, pero el tratamiento N es diferente al resto de los tratamientos ensayados en esta etapa, como se aprecia en el anexo 20.

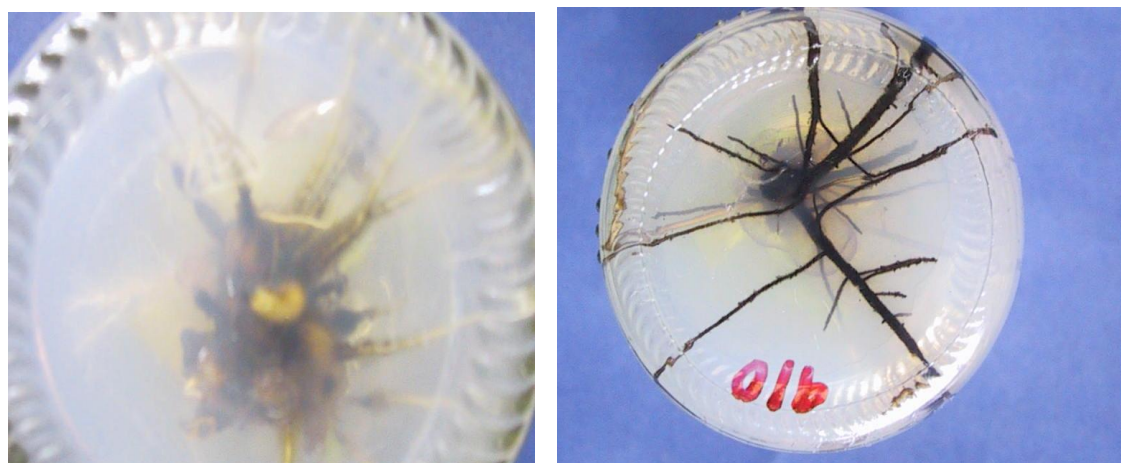
6.4. ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DE LAS PLÁNTULAS.

6.4.1. Número de raíces por explantes.

El tratamiento que produjo la mayor cantidad de raíces por explante fue el E con un promedio de 6.0, seguido de los tratamientos G, I y H con 5.6; 5.0 y 4.6 raíces por explantes en los respectivos medios de cultivos (cuadro 19 y figura 19). La mayor parte de estas raíces son aéreas, es decir se desarrollan fuera del medio de cultivo; estas raíces son

de color blanco con abundancia de pelos absorbentes. Las raíces que se desarrollan en los medios de cultivos son de color negro y más gruesas que las raíces aéreas (Figura 18).

A los 10 días después de la siembra de las plántulas en los medios de enraizamiento, se empiezan a observar las primeras raíces en los tratamientos G y J, los cuales están gelificados con 0.6 y 0.9 % de agar respectivamente; Estos medios de cultivo se encuentran sin el regulador de crecimiento ANA (Acido Naftalenoacético).



a- Tratamiento E

b- Tratamiento G

Figura 18. Número de raíces producidas en los tratamientos E y G, durante 21 días en la etapa de enraizamiento.

A los resultados del número promedio de raíces obtenidos en esta etapa, se les aplicó en análisis de varianza mostrando la existencias de diferencias a nivel de los tratamientos ($\alpha=5\%$, anexo 21). La prueba de Duncan muestra que los tratamientos E, G, I y H son estadísticamente iguales entre sí, pero estos a la vez son diferentes a los tratamientos B, C, A y F; las diferencias y similitudes entre todo los tratamientos puede observarse en el anexo 22.

Cuadro 19. Número promedio de raíces a los 28 días después de la siembra del híbrido FHIA-21, en los diferentes tratamientos durante la etapa de enraizamiento.

Repet.	T R A T A M I E N T O S											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
I	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	8.0	2.0	12	5.0	3.0	9.0
II	2.0	0.0	0.0	2.0	7.0	0.0	2.0	4.0	5.0	2.0	4.0	0.0
III	0.0	0.0	0.0	0.0	12	3.0	4.0	1.0	4.0	4.0	3.0	1.0
IV	0.0	0.0	0.0	4.0	5.0	0.0	4.0	12	0.0	7.0	0.0	6.0
V	0.0	0.0	0.0	3.0	6.0	1.0	10	4.0	4.0	3.0	1.0	1.0
Prom.	0.4	0.0	0.0	2.4	6.0	0.8	5.6	4.6	5.0	4.2	2.2	3.4

6.4.2. Longitud de las raíces de los explantes.

A los 28 días después de la siembra de los explantes, las raíces en el medio de enraizamiento alcanzaron longitudes promedio de 3.46, 2.34 y 1.62 cm., en los tratamientos J, G y E respectivamente (cuadro 20 y figura 19).

El análisis de varianza muestra que a nivel de los tratamientos empleados en esta etapa, existen diferencias altamente significativas ($\alpha=1$ y 5%, anexo 23). La prueba de Rango Múltiple de Duncan muestra que el tratamiento J es estadísticamente igual al tratamiento G; pero es significativamente diferentes al resto de tratamientos (Anexo 24).

La figura 19 muestra las relaciones que se presentan entre los diferentes tratamientos y el número y las longitudes de las raíces. Se aprecia en esta figura que el tratamiento E compuesto por medio MS, 0.5 mg/l de ANA y gelificado con 0.6% de agar produce la mayor cantidad de raíces (cuadro 19), mientras que en el tratamiento J gelificado con 0.9% de agar produce en promedio raíces de 3.46 cm de largo (cuadro 20). En los tratamientos B y C no se observó desarrollo de raíces. Los tratamientos que tienen una relación aceptable en cuanto al número y la longitud de las raíces son el G y el J, en estos medios de cultivos se producen 6 y 4.2 raíces por explantes cada una de ellas con una longitud promedio de 2.32 y 3.46 cm.

Cuadro 20. Longitud promedio de las raíces a los 28 días después de la siembra, en los diferentes medios de enraizamiento.

	T R A T A M I E N T O S											
Repet.	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
I	0.0	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.6	2.0	0.7	2.1	0.5	0.9
II	0.0	0.0	0.0	0.3	2.0	3.0	3.5	1.0	2.2	1.7	1.0	0.0
III	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	0.2	3.0	0.1	1.0	4.0	0.1	1.5
IV	0.0	0.0	0.0	1.5	2.5	0.0	3.0	0.7	0.0	6.0	0.0	1.0
V	0.0	0.0	0.0	1.2	1.6	0.8	1.5	0.8	0.8	3.5	0.3	0.9
Prom.	0.0	0.0	0.0	1.2	1.62	0.8	2.32	0.92	0.94	3.46	0.38	0.86

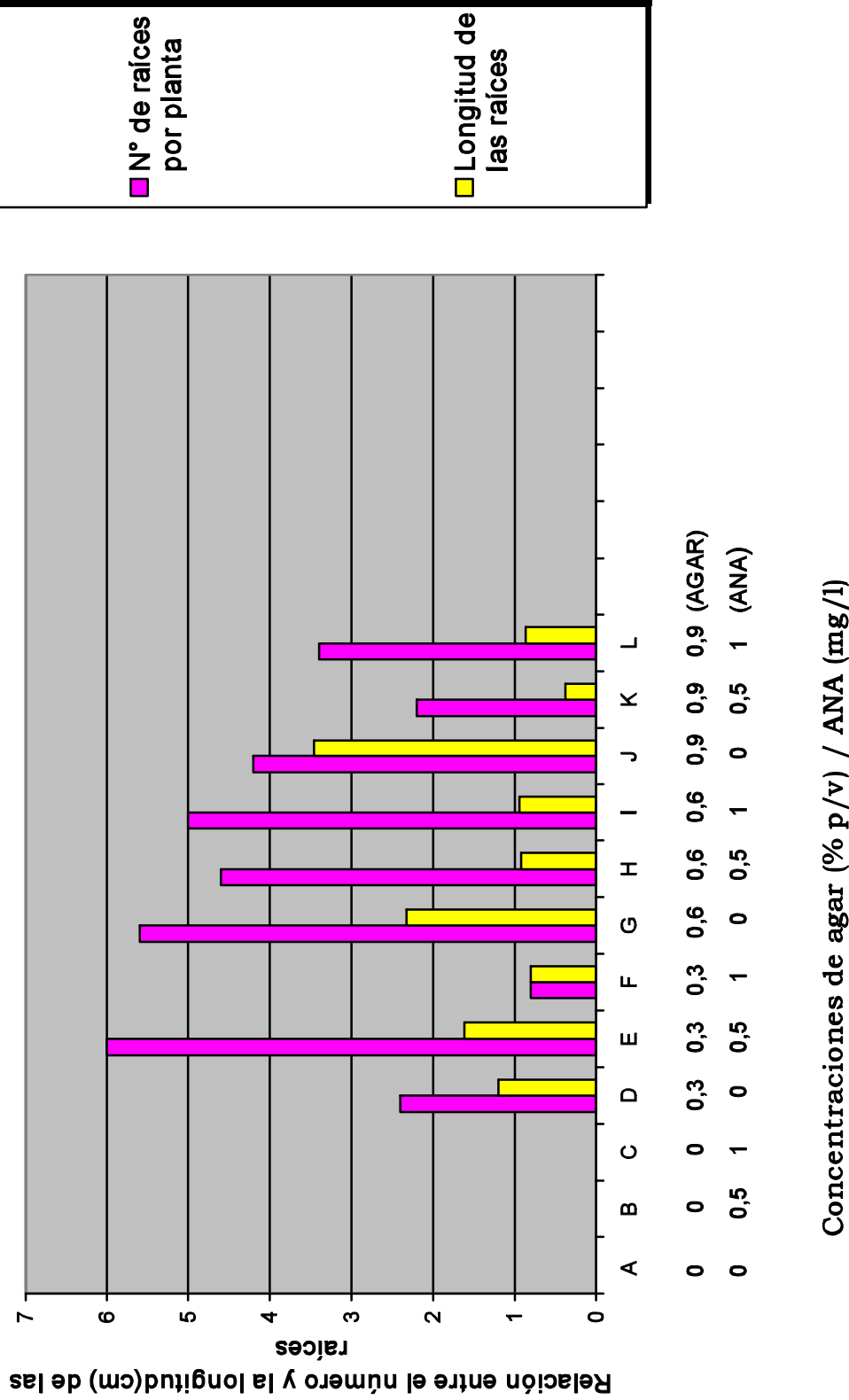


Figura 19. Relación del número y longitud de las raíces a los 28 días después de la siembra en los diferentes tratamientos utilizados en la etapa de enraizamiento.

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1. ETAPA DE DESINFECCIÓN DE LOS EXPLANTES.

Para la asepsia de los materiales vegetales, son mucho los productos utilizados para separar de las superficies vegetales el gran número de microorganismos, que pueden llegar a contaminar el medio de cultivo y ser una limitante en el éxito. Debe tenerse en cuenta que en general estos tratamientos se realizan para explantes con presencia de hongos en su superficie, ya que debido a su dificultad en la asepsia, cuando se trata de contaminaciones bacterianas o debido a hongos sistémicos se prefiriere descartar estos materiales para su cultivo "in vitro". Es necesario que cada laboratorio tenga su propio protocolo en plátano, debido a que las fuentes de origen de los materiales y manejo en el campo son diferente, razón por la cual se hizo necesario evaluar diferentes trabajos propuestos por otros investigadores, pero modificando los factores que están incidiendo en la presencia de contaminantes en los explantes, para lograr la máxima viabilidad sin ningún tipo de contaminación de los ápices meristemáticos.

Durante muchos años se ha utilizado el hipoclorito de sodio (NaOCl), como un esterilizante superficial en los tejidos de las plantas (Wilson, 1915). Comparándolo con otros desinfectantes, este tiene la ventaja de que se enjuaga más fácilmente de la superficie después de la esterilización y así se eliminan los residuos oxidantes indeseables.

La concentración de NaOCl más indicada para la desinfección de los ápices meristemáticos de *Musa baibisiana*, híbrido FHIA-21, fue la de 2.0% (cuadro 14 y figura 5), lo cual difiere de las concentraciones utilizadas por Sandoval, 1990 (5.25% sin diluir), seguido de una segunda desinfección con diluciones de un 10% de NaOCl (Sandoval and Muller, 1990, Banejee et al., 1986) y Jaramillo 1993 (2,5% a partir de clorox comercial). En esta etapa el

tiempo de desinfección fue de 90 minutos, lo cual es diferente a los tiempos reportados por Jaramillo, 1993 (105 minutos), Sandoval and Muller, 1990 (30 minutos). Todas estas diferencias son debidas posiblemente al tamaño de los explantes y a las condiciones climáticas del cultivo. Esta concentración de NaOCl fue la preparación más útil como germicida, ya que esterilizó superficialmente el material del híbrido FHIA-21; además, a esta concentración el ingrediente activo (Cl) del desinfectante no causó lesiones a nivel de los tejidos internos y externos de los explantes. Con la concentración de NaOCl al 1.5% se presentó una alta contaminación de los meristemos apicales, debido a que el ingrediente activo se encontraba muy diluido y no fue capaz de esterilizar o eliminar a los patógenos que se encontraba en los explantes; A baja concentración del desinfectante (1.5%), los patógenos son tolerantes al ingrediente activo del NaOCl. Las concentraciones de NaOCl al 2.5% por tiempos prolongados elimina los patógenos superficiales y provoca toxicidad en el tejido del explante, ya que el ingrediente activo por sus altas concentraciones quema la superficie del meristemo apical provocando la muerte de este en los medios de cultivos.

Para la asepsia y supervivencia del material en los medios de cultivos, el tamaño de los meristemos apicales juega un papel primordial, ya que se ha postulado como regla general que en la medida en que el explante es más pequeño menor es su capacidad de supervivencia; si se tiene en cuenta que un menor número de células son las que deben asumir los efectos causado por el desinfectante. El estrés de separación del explante es mayor, cuando el tamaño del explantes es más pequeño. A medida que el tamaño del explante aumenta, se disminuye la posibilidad de lograr los objetivos de libertad de patógenos, debido a que el desinfectante no penetra adecuadamente en los tejidos primarios del explante. A diferencias de otros investigadores que realizaban lavado de los explantes con dos gotas de Tween-20 y enjuague con agua destilada para eliminar el NaOCl de la superficie de los explantes, se encontró que no era necesario, debido a que cada vez que se realizaba la reducción del tamaño de los explantes, se retiraban las vainas foliares más externas de los rizomas, lo cual permitía remover el ingrediente activo del desinfectante y los residuos oxidantes que causan daño al meristemo apical.

7.2. ETAPA DE ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO "IN VITRO".

El éxito del cultivo de tejido vegetales depende sustancialmente del medio de cultivo empleado. Para establecer un sistema de cultivo de tejido, se elabora primero un medio nutritivo óptimo que se ajusta a los principales requerimientos nutricionales de la especie vegetal, al tipo de explante y al sistema de cultivo. La efectividad de un cultivo depende tanto del ingrediente básico, como del agente gelificante (Romberger and Tabor, 1971; Bending, 1974; Lonz et al. 1983).

En el Laboratorio de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, la utilización de medio MS gelificado con 0.3 y 0.6% de agar, presentaron los mejores resultados a nivel del crecimiento y desarrollo de los explantes (cuadro 15 y figura 6), debido a que estas concentraciones provee al medio de cultivo de un excelente gel húmedo que sirve de soporte al inoculo y facilita la absorción de nutrientes a los explantes. Los explantes sembrados en medios líquidos sin agitación, presentaron un alto porcentaje de mortalidad debido a que los meristemos apicales quedaron totalmente sumergidos en el medio de cultivo, lo cual retrasó o inhibió el crecimiento de los explantes por la falta de oxígeno, dificultándose así la respiración. En cambio que los explantes sembrados en medio MS, gelificado con 0.9% de agar hace que la supervivencia disminuya y aumente la mortalidad de los meristemos apicales debido a que los medios muy gelificados o muy sólidos la disponibilidad de nutrientes disminuye considerablemente, haciendo que los explantes mueran por la falta de elementos necesarios para su nutrición.

Para el establecimiento del cultivo "in vitro" de *Musa balbisiana*, híbrido FHIA-21, se recomienda la utilización de medio MS gelificado con 0.3% de agar, ya que este medio no afecta en crecimiento de los explantes y permite una reducción en el costo de producción de una manera significativa, por el alto precio que tiene el agar en el mercado nacional.

El agar se utiliza para gelificar el medio de cultivo y dar sostén a los explantes, pero la gelificación del medio debe ser adecuada, ya que la mala gelificación causa cambio en el pH. Cuando la concentración de agar es muy baja puede presentarse un aumento en la

evaporación del agua. Esta pérdida se contrarresta aumentando la humedad relativa del cuarto de cultivo o sellando los frascos con una capa de papel aluminio y una capa de papel vinilpex.

7.3. ETAPA DE MULTIPLICACIÓN DE LOS BROTES.

En los explantes divididos longitudinalmente en cuatro secciones iguales, se dio la proliferación de yemas al costado de cada segmento dado a que en ese lado se encontraban las yemas descubiertas. En cada una de las divisiones realizadas en esta etapa a los explantes mas desarrollados se le cortaron los primordios foliares más externos que conformaban al pseudotallo, de tal manera que los rizomas más pequeños quedaran con los primordios y con yemas descubiertas. Estos cortes permiten reducir la dominancia apical de los rizomas y facilita la proliferación de la yemas (Jaramillo, 1993).

7.3.1. Producción de brotes.

La producción de brotes en el medio de cultivo compuesto por sales MS, 5 mg/l de BAP y gelificado con 0.6% de agar es de 2543.8 brotes por tratamiento hasta la sexta división (cuadro 16 y figura 13). Este incremento se debe a que el agar a una concentración de 0.6% gelifica los medios de cultivos adecuadamente, constituyéndolos en medio de sostén óptimos lo cual facilita la toma de nutrientes por parte de los explantes, además, el regulados de crecimiento BAP a una concentración de 5 mg/l estimula la división celular y por ende el desarrollo de los brotes múltiples (figura 8). En los medios de cultivo líquidos no se da la proliferación de los brotes, debido a que los explantes quedan totalmente sumergido en estos medios, lo cual retrasa o inhibe el crecimiento de los brotes por la falta de oxígeno para la respiración; caso parecido sucede con los tratamientos semilíquidos que por su consistencia y por el tamaño de los explantes estos quedan parcialmente sumergido en los medios de cultivo, presentándose tal vez dificultad para la respiración, lo cual inhibe el desarrollo de los brotes. En cambio los tratamientos muy

sólidos (gelificados con 0.9% de agar), no presentaron un desarrollo adecuado de brotes debido a que las altas concentraciones de agar disminuyen la disponibilidad de nutrientes y complejos orgánicos a los explantes en los medios de cultivo.

Jaramillo (1993), puntualiza que " existe una relación estrecha entre la cantidad de medio y el tamaño de los explantes. Si el explante queda totalmente sumergido en el medio se retrasa o inhibe el crecimiento; tal vez por falta de oxigenación para la respiración, lo que no sucede con un explantes en medio líquido con agitación", mientras que Montoya (1991) dice que " el aumento en el potencial osmótico debido a altas concentraciones de agar y la concomitante disminución de la disponibilidad de nutrientes y complejos orgánicos son razones para disminuir el agar en los medios de cultivo".

Otro factor que incide en el desarrollo de los brotes durante la multiplicación de los explantes es la falta o baja concentración del regulador de crecimiento BAP, ya que estas concentraciones no estimulan la división celular y el desarrollo de los brotes, pero estimula el desarrollo de raíces en los explantes, como pudo observarse en los tratamientos ensayados sin regulador de crecimiento donde se observó desarrollo de raíces independientemente de la concentración de agar utilizada en los medios (figura 14). En cambio que en las concentraciones mayores a 5 mg/l de BAP las plantas no se multiplican debido a que las altas concentraciones del regulador de crecimiento inhibe la división celular de los explantes (Wong, 1986; Zamora et al., 1986).

Para la multiplicación de los rizomas Orozco y Londoño (1986); Angarita y Perea (1991), utilizaban concentraciones de BAP de 5 mg/l con buenos resultados. Según Jaramillo (1993), en el proceso de multiplicación de *Musa textilis*, se observó que las mejores dosis de BAP oscilaban entre 3-5 mg/l, con dosis mayores a 6 mg/l las plántulas no se multiplicaban, mientras que a bajos niveles (1 mg/l) se estimulaban el desarrollo radical, como puede observarse en algunos de los tratamientos utilizados para la multiplicación masiva de híbrido FHIA-21.

Además Devlin, (1980) dice "para que pueda tener lugar la división celular debe de sucederse una cadena de hechos como: Síntesis de ADN, mitosis y citocinesis, en los cuales la presencia de citocininas (BAP) es necesaria para la mitosis; además, si la citocinina está presente en concentraciones elevadas puede volverse limitante por lo menos en uno de los tres pasos necesarios para la división celular; este hecho puede haberse presentado cuando se utilizó 10 mg/l de BAP en algunos de los tratamientos evaluados en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre.

7.3.2. Tasa de multiplicación de los brotes.

La tasa de multiplicación entre los tratamientos y divisiones varía significativamente, como lo muestra la Prueba de Duncan (Anexos 17 y 18). Estas diferencias se deben básicamente a las concentraciones de agar y BAP utilizadas en los medios de cultivo, como también puede deberse al estado fisiológico de los explantes. La Prueba de Duncan muestra las similitudes estadísticas entre los tratamientos J, K y M; estas similitudes pueden deberse a que las concentraciones de agar utilizada en los medios de cultivo son útiles para el sostenimiento de los explantes, pero la disponibilidad de nutrientes en cada uno de estos medios es diferente. Además, que la concentración de BAP en cada uno de esos tratamientos es diferente, lo cual estimula en mayor grado a unos explantes más que a otros. Al nivel de las divisiones, esta variación es debida a las razones antes expuestas, como también a los mecanismos fisiológicos provocados por una larga incubación y una inducción mecánica de la brotación. Además, la disminución progresiva de la tasa de multiplicación observada a través de las divisiones en los tratamientos puede deberse también a los niveles endógenos de los reguladores de crecimiento.

7.3.3. Número de hojas por explantes.

El desarrollo de las hojas al igual que la producción de brotes y la tasa de multiplicación de los explantes depende de factores como la consistencia del medio de cultivo y del regulador

de crecimiento BAP. A pesar de que los tratamientos N, Ll, K y F son estadísticamente iguales, se diferencian en la vigorosidad y desarrollo de las hojas.

Los tratamientos semisólido K (5 mg/l BAP / 0.6% agar) y el sólido N (5 mg/l BAP / 0.9% agar), son medios que permiten el sostenimiento de los explantes; el vigor de los explantes y hojas principalmente en el tratamiento K, se debe a que el regulador de crecimiento BAP a una concentración de 5 mg/l activa la división celular y estimula el alargamiento de las hojas.

Para la multiplicación masiva de *Musa babisiana*, híbrido FHIA-21, en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales se utiliza medio de cultivo compuesto por sales MS, un regulador de crecimiento BAP a una concentración de 5 mg/l y 0.6 % de agar para la gelificación del medio de cultivo, debido a que este medio sirve de soporte y facilita la toma de nutriente de los explantes; además, el regulador de crecimiento BAP a una concentración de 5 mg/l activa la división celular de los explantes, produciendo en promedio 646.08 brotes por explante con una tasa de multiplicación de 5 y cada plántula produce en promedio 3.25 hojas hasta la sexta división.

7.4. ETAPA DE ENRAIZAMIENTO DE LAS PLÁNTULAS.

Los tratamientos líquidos (sin agar) y semilíquido (0.3% agar), dada su consistencia no se constituyen en medios de sostén para los explantes, debido a que estos quedan total y parcialmente sumergidos en estos medios. En los tratamientos líquidos las plántulas mueren por ahogamiento debido a la falta de oxígeno para la respiración; mientras que en los medios semilíquidos, los explantes desarrollan raíces delgadas y frágiles, las cuales no sirven para el sostenimiento de la plántula en el medio. Los tratamientos semisólidos (0.6% agar) y sólidos (0.9% agar), son excelentes medios que permiten el sostenimiento de las plántulas, pero se diferencian en que los medios semisólidos la disponibilidad de nutrientes para las plántulas es mucho mayor que en los medios sólidos.

Los tratamientos J y G son estadísticamente iguales en número y longitud de las raíces (anexos 22 y 24). En estos medios la formación de raíces es más rápida, debido a que los tejidos de estas plántulas producen sus propias auxinas, las cuales estimulan e incrementa el sistema radical.

Melchers (1971), dice que a pesar de que el cultivo requiera de auxinas exógenas no indica que los tejidos sean incapaces de sintetizar sus propias auxinas, aunque ya se ha comprobado que en el cultivo existe una habituación celular a la aplicación auxínica exógena, perdiéndose poder morfogenético por esta característica.

La adición de auxinas exógenas como el ANA estimula la producción de raíces en los medios de cultivos semisólidos y sólidos pero con menor rapidez que en los tratamientos sin regulador de crecimiento, debido posiblemente a que el ANA como es un regulador de crecimiento sintético se acumula en los tejidos de los explantes, además, tiene un periodo activo relativamente largo al aplicarla exógenamente, pues tal auxina es más estable debido a que existen pocos sistemas enzimáticos en las células que la ataquen fácilmente, por lo que tiende a acumularse, al punto de llegar ser tóxicas (Bidwell, 1979).

El ácido Naftaleno acético (ANA), es utilizado por Cronauer y Crikorian a razón de 1.0 mg/l, junto con 0.25% de carbón activado el cual incrementa la formación de raíces, pero estas pueden desarrollarse sin él, como sucede en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad de Sucre, donde al medio de enraizamiento se le suprime el BAP y no se le adiciona ANA, lográndose un buen desarrollo radical, a pesar de que no se utiliza carbón activado como lo recomiendan dichos autores.

Para la etapa de enraizamiento se recomienda el tratamiento compuesto por Sales MS y gelificado con 0.6% de agar, pero sin regulador de crecimiento, ya que en este medio de cultivo las raíces se desarrollan óptimamente y dada la consistencia que presenta facilita la extracción de las plántulas sin daños mecánicos en sus raíces. Las raíces que se producen en este medio de cultivo son óptimas para que las plantas puedan adaptarse al medio externo sin ningún problema (invernadero), (Figura 18 b); estas raíces son muy parecidas en forma

y tamaño a las mostradas por Hamilton, (1965); Orozco y Londoño, (1986) en las figuras 5 y 6 de sus artículos respectivamente. Además, con este medio se reducen costo de producción de manera significativa, debido al alto precio que tiene el agar y el regulador de crecimiento ANA en el mercado nacional.

8. CONCLUSIONES.

- La extracción de meristemos apicales a partir de plantas madres sembrados y controlados en casa malla, contribuyen a mejorar las condiciones asépticas para el establecimiento del cultivo “in vitro” de *Musa baibisiana*, híbrido FHIA-21.
- La concentración de 2.0% de hipoclorito de sodio por tiempos de 50, 30 y 10 minutos, elimina en un 95.83% los microorganismos exógenos contaminantes, causando daños insignificantes en los tejidos de los explantes.
- El medio de cultivo compuesto por sales de Murashige y Skoog (MS) y gelificado con 0.3% de agar, fue el más apropiado para el establecimiento del cultivo “in vitro”, ya que los explantes del híbrido FHIA-21 se desarrollaron óptimamente en este medio.
- Los explantes de un diámetro de 0.5 cm x 0.5 cm de lado con 0.5 cm de tejido apical y 0.5 cm de tejido foliar, se desarrollan óptimamente en los medios de iniciación.
- El medio de cultivo compuesto por sales MS. complementados con 5 mg/l de BAP y gelificado con 0.6% de agar, fue el más apropiado para la etapa de multiplicación, debido a que en este medio se observa la más alta producción de brotes, tasa de crecimiento y desarrollo de las hojas.
- El corte en cruz realizado a cada meristemo apical para obtener cuatro segmentos iguales, permitió la proliferación de brotes a un costado de cada segmento en el medio de multiplicación.

- La eliminación de la dominancia apical de los explantes aumentó considerablemente la producción de brotes y la tasa de multiplicación en el cultivo “*in vitro*” de *Musa baibisiana*, híbrido FHIA-21.
- A partir de un meristemo apical del híbrido FHIA-21 se puede obtener en promedio 2543.8 brotes en un periodo de cuatro meses, adicionándosele al medio de cultivo 5 mg/l de BAP y 0.6 % de agar.
- Dadas las características de las plantas de *Musa baibisiana*, híbrido FHIA-21, estas no requieren de medios complejos para el enraizamiento; lo cual necesita solamente de un medio de cultivo compuesto por sales MS y disminuir la concentración de sacarosa a 20 gr/l para producir raíces sanas y vigorosas.
- Por cada frasco tipo " mayonesa" se pudo introducir de 3 a 4 explantes para masificar el cultivo y optimizar el espacio disponible, obteniéndose buena respuesta de cada uno de ellos

9. RECOMENDACIONES.

- Con el propósito de reducir costos de transporte de los rizomas y mejorar las condiciones asépticas del cultivo “in vitro”, se debe desarrollar un sistema de producción de yemas a partir de rizomas grandes sembrados en eras o camas preparadas bajo condiciones preparadas, para evitar riesgo de contaminación. Para esto hay que tener en cuenta las condiciones asépticas del lugar de establecimiento y de las plantas madres.
- En la etapa del cultivo “in vitro” debe hacerse un estudio, para determinar el tamaño adecuado de siembra del meristemo apical, debido a que los explantes muy pequeños tienen menor capacidad de supervivencia, mientras que con explantes grandes, se disminuye la posibilidad de establecer un cultivo aséptico.
- Evaluar en la etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”, la respuesta de los explantes del híbrido FHIA-21, en medio líquido con agitación.
- Evaluar para *Musa babiasiana*, híbrido FHIA-21 un sistema de sellado con tapas plásticas, papel aluminio, vinilpex, parafilm u otro tipo de plástico autoadhesivo y la combinación de las misma, para el control de factores que afecta la tasa de crecimiento como son la contaminación, intercambio gaseoso y la calidad y cantidad de luz.
- Dentro del proceso de multiplicación “in vitro” de plantas, es muy importante determinar las condiciones ambientales y nutricionales necesarias para la adaptación de las plantas al medio externo (invernadero), debido a esto se hace necesario evaluar estas condiciones para que sé de un buen desarrollo y supervivencia del material.

- Hacer un estudio comparativo a nivel de campo entre los materiales del híbrido FHIA-21 obtenidos en el Laboratorio de cultivo de Tejidos y materiales cultivados por métodos convencionales, para determinar cual de ellos son más rentables y productivos en el campo.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

ANGARITA, A; PEREA, M. Micro propagación de plántulas de plátanos y bananos. En: Roca, W.; Mroginski, L. (Editores). Cultivo de Tejido en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones. CIAT. Colombia. 1991; p 493-512.

BANERJEE, N.; VUYLSTERKE, G. and De LANGHE, E.A.L. Meristem tip culture of musa: Histomorfological studies of shootbud proliferation Whither, L.A. and D.G. Anderson. Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications. Butterworths. 1986, P. 139-147.

BELALCAZAR, L.C. S. y BORICA, C. P. et al. Generación de tecnología para el cultivo y producción rentable del plátano en la Zona Cafetera Central Colombiana. IDR CCIID Canadá. Armenia, Colombia 1990.

BENDING, H. R. Regeneration van haploiden und pflanzen aus protoplasten van. *Petunia hybrida*. L. Z. *pflanzen physiol* 74 (1974): 327-356.

BIDWELL, R. S. S. Fisiología vegetal. AGT. Editor , Mexico. 1ª ed. 1979. En: Hurtado, M. ,y Merino M.(Editores). Cultivo de Tejidos vegetales. Ed. Trilla, 1994.

CORPORACION FHIA BANANOS Y PLATANOS. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola. Programa de mejoramiento de bananos y plátanos. 02/10/1999. fhia simon.in tertel.hn.

CRONAUER, S. and KRIKORIAN, A. Reinitiation of vegetative growth from aseptically cultured terminal floral apex of banana. In: American Journal of Botany. Vol. 72, No. 10 (1985); p. 1598 - 1601.

CRONAUER, S. and KRIKORIAN, A. Aseptic multiplication of banana from excised floral apices. In: Hortscience. Vol. 20, No. 4 (1985); p. 770 – 771.

DEVLIN, R. M., Fisiología vegetal. Ed. Omega, Barcelona, España 1990. En: Hurtado m., y Merino M. (Editores). Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed. Trilla. 1994.

DORE, S. R.; RAO, N. K. and CHACKO, E. K. Tissue culture propagation of banana. In: Scientia Hortic. Vol. 18 (1983); p. 247 – 252.

HAMILTON, K. S. Reproduction of banana from adventitious buds. Tropical Agriculture (Trinidad). N° 42 (1965); p. 69 –73.

INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (I. C. A.). Prevención y manejo de la Sigatoca negra. Ministerio y Desarrollo Rural. 1997.

JARAMILLO, V. S. Experiencia sobre el montaje de un laboratorio y la micro propagación de banano (*Musa sp*) – Convenio Universidad Nacional - C.I. UNIBAN. Medellín, Colombia. 1993.

KRIKORIAN, A. D., et al. Protoplas culture of perennials. In: Scientia Horticulturae. Vol. 37, N° 3 (1988); p. 277 – 293.

LONZ, H.; LARKING, P. J. y SCOWEROFT. W. R. Improved protoplast culture and agarose media. Plant Cell Tissue Organ Culture 2 (1983); p. 217-226.

MA, S. S. and SHIH, C. T. In vitro formation of adventitious buds in banana shoot apex following decapitation. In: Journal Chinese Society of Horticultural Science. Vol. 18, N° 3 (1972); p. 135 – 142.

MANTE, S. and TEPPER, H. B. Propagation of *Musa textiles*, nee plants fom apical meristem slices in vitro. In: Plant cell. Organ Culture. Vol. 2 (1983); p. 151 – 159.

MELCHERS, G., “Transformation or habituation to autotrophy and tumor growth and recovery”, en les cultures de tissues des plantes, colloques Internationaux du C. N. R. S., núm. 193 (1971): 229-284.

REPÚBLICA DE COLOMBIA. MINISTERIO DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL. Anuario estadístico del sector agropecuario y pesquero. Santa fe de Bogotá, D.C; 2001.

MONTOYA, H. L. M. Cultivo de Tejidos Vegetales. Medellin, Colombia. 1991.

MURASHIGE, T., “Plant propagation through tissue culture”, Annual review of plant physiology, 25 (1974): 135-166.

OROZCO, C.; LONDOÑO R., L. C. Estudio de las yemas de Cormo del plátano. *Musa sp* (AAB) y su estudio in vitro En: Cenicafé (Colombia) Vol. 37, No. 3 (1986); p. 75-86.

PEREA, D. M. La nueva revolución verde. En: Revista Universidad Nacional de Colombia. N° 19 (1990); p. 76 – 83.

PLAN OPERATIVO. Sistema de producción de plátano. Contribución de Corpoica a la Investigación de desarrollo agropecuario colombiano. Ed. Prodomedio. Colombia, 1998.

QUAK, F., “Meristem culture and virus- free plants”. En: Plant cell, tissue and organ culture. Ed Reinert, J., y Bajaj, Y. P. S. Sppring-Verlang. Berlín, 1977. p 598-615.

ROCA, W. M, y MROGINSKY, L. A. Cultivo de Tejido en la agricultura. Publicación CIAT No 151. Colombia. 1991.

ROMBERGER, J. A. and TABOR, C. A. The *Picea abies* shoot apical meristem in culture: Agar and autoclaving effects. *Amer J. Bot* 58(1971): 131-140.

ROWE, P. R. Breeding and “intractable” crop: banana. P. 66 – 83. In: RACHIE, K. O. and LYMAN, J. M., ed. Genetic engineering for crop improvement conference. New York: The Rockefeller Foundation, 1981.

SANDOVAL, J.; MULLER, L. Multiplicación vegetativa in vitro de *Musa*. Mimeografiado. 1990. 15 p.

SIMMONDS, N. W. and SHEPERD, K. The taxonomy and origins of the cultivated banana. In: *Journal of Linnean Society of London*. Vol. 55, N° 359 (1955); p. 302-312.

VERA, E. R. Bioestadística aplicada al cultivo de tejidos vegetales. En: *Cultivo de tejidos vegetales*. Editorial trilla. México 1987. p. 162 – 168.

VUYLSTEKE, D; SWENEN, R; WILSON, G; DE LANGHE, E. Phenotypic variation among in vitro propagated plantain (*Musa sp.* cultivar AAB). In: *Scientia Horticulturae*. Vol. 36, N° 1, 2 (1988); p. 79- 88.

WALKEY, D. G. A. “In vitro methods for virus elimination”. En: *Frontiers of plant tissue culture*. Ed. Por Thorpe, T. A., 1978. pag. 245-154.

WILSON, J. K. Calcium hypochlorite as a seed sterilizer. *Amer J. Bot.* 2(1915): 420-427.

WONG, W. C. In vitro propagation of banana (*Musa spp*): initiation, proliferation and development of shoot tip cultures a defined media. Plant cell, tissue and organ culture. N° 6 (1986); p. 159 – 166.

ZAMORA, A. B.; BARBA, R. C. AND DAMASCO, O. P. 1986. Status and prospects of tissue culture research on bananas. In: Banana and plantain research and development. Edited by UMALI, B. E. and LANTICAN, C. M. Proceedings of an international cook shop. Davad, Philippinas. PCARRD Book series N° 41(1987); p. 78 -88

ANEXOS

Anexo 3. Valores promedios de dos replicas realizada en cada tratamientos de la etapa de desinfección.

NUMERO DE EXPLANTES VIVOS.

Repetic.	T R A T A M I E N T O S					
	A		B		C	
	Replica 1	Replica 2	Replica 1	Replica 2	Replica 1	Replica 2
1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	0	1	1	1
3	0	0	1	1	1	0
4	0	0	1	1	1	1
5	0	1	1	1	1	1
6	1	0	1	1	1	0
7	0	0	1	1	1	1
8	0	1	1	1	0	1
9	1	0	1	1	1	1
10	1	1	1	1	1	0
11	1	0	1	1	1	1
12	0	0	1	1	1	1
Total	6	5	11	12	11	9
Prom.	5.5		11.5		10	

NUMERO DE EXPLANTES CONTAMINADOS.

Repetic.	T R A T A M I E N T O S					
	A		B		C	
	Replica 1	Replica 2	Replica 1	Replica 2	Replica 1	Replica 2
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	1	0	0	0
3	1	1	0	0	0	0
4	1	1	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0
6	0	1	0	0	0	0
7	1	1	0	0	0	0
8	1	0	0	0	0	0
9	0	1	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	1	0	0	0	0
12	1	1	0	0	0	0
Total	6	7	1	0	0	0
Prom.	6.5		0.5		0	

NUMERO DE EXPLANTES MUERTOS.

	T R A T A M I E N T O S					
	A		B		C	
Repetic.	Replica 1	Replica 2	Replica 1	Replica 2	Replica 1	Replica 2
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	1
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	1	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	1
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
Total	0	0	0	0	1	3
Prom.	0		0		2.0	

Anexo 4. Análisis de varianza del número de explantes vivos, en la etapa de desinfección.

Título: Etapa de desinfección

Variabes: Número de explantes vivos

Repeticiones: 1 al 12

Factor de corrección: 20.25

Suma de cuadrado totales: 4.25

Suma de cuadrado de tratamientos: 1.625

Suma de cuadrado del error experimental: 2.625

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. medios	Fc.	Ft.	
					0.05	0.01
Tratamientos	(t-1)= 2	1.625	0.8125	10.22	3.30	5.34
E. experimental	T(r-1)= 33	2.625	0.0795			
Total	(n-1)= 35	4.25				

Nota: Si Fc es mayor que Ft. Hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Coefficiente de variación: 37.6%

Anexo 5. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de explantes vivos en la etapa de desinfección.

Título: Etapa de desinfección

Variables: Número de explantes vivos

Error standard: 0.0813

P	2	3
RES	2.89	3.04
RMS	0.235	0.247

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los tratamientos ordenados de menor a mayor.**

—	—	—
A	C	B
0.458	0.83	0.95

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

—	—	—
A	C	B
—————		

Nota: Los tratamientos unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.

Anexo 6. Análisis de varianza del número de explantes contaminados, en la etapa de desinfección.

Título: Etapa de desinfección

Variables: Número de explantes contaminados

Repeticiones: 1 al 12

Factor de corrección: 1.36

Suma de cuadrado totales: 4.13

Suma de cuadrado de tratamientos: 2.18

Suma de cuadrado del error experimental: 1.95

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. medios	Fc.	Ft.	
					0.05	0.01
Tratamientos	(t-1)= 2	2.18	1.09	18.36	3.30	5.34
E. experimental	T(r-1)= 33	1.95	0.0593			
Total	(n-1)= 35	4.13				

Nota: Si Fc es mayor que Ft. Hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Coefficiente de variación: 83.5%

Anexo 7. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de explantes contaminados en la etapa de desinfección.

Título: Etapa de desinfección

Variables: Número de explantes contaminados

Error standard: 0.070

P	2	3
RES	2.89	3.04
RMS	0.203	0.212

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los tratamientos ordenados de menor a mayor.**

—	—	—
C	B	A
0	0.0416	0.541

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

—	—	—
C	B	A
—————		

Nota: Los tratamientos unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.

Anexo 8. Análisis de varianza del número de explantes muertos, en la etapa de desinfección.

Título: Etapa de desinfección

Variabes: Número de explantes muertos

Repeticiones: 1 al 12

Factor de corrección: 0.11

Suma de cuadrado totales: 0.88

Suma de cuadrado de tratamientos: 0.22

Suma de cuadrado del error experimental: 0.66

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. medios	Fc.	Ft.	
					0.05	0.01
Tratamientos	(t-1)= 2	0.22	0.11	5.49	3.30	5.34
E. experimental	T(r-1)= 33	0.66	0.020			
Total	(n-1)= 35	0.88				

Nota: Si Fc es mayor que Ft. Hay diferencias significativas entre los tratamientos.

Coefficiente de variación: 85.19%

Anexo 9. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de explantes muertos en la etapa de desinfección.

Título: Etapa de desinfección

Variables: Número de explantes muertos

Error standard: 0.041

P	2	3
RES	2.89	3.04
RMS	0.118	0.124

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los tratamientos ordenados de menor a mayor.**

—	—	—
A	B	C
0	0	0.166

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

—	—	—
A	B	C
—————		

Nota: Los tratamientos unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.

Anexo 10. Valores promedios de dos replicas realizado en cada tratamiento en la etapa de establecimiento del cultivo "in vitro".

NÚMERO DE EXPLANTES VIVOS

T R A T A M I E N T O S								
Repet.	A		B		C		D	
	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 1	Repl. 2	Repl.1	Repl. 2
1	0	1	1		1	1	0	0
2	0	0	1	1	1	1	1	1
3	1	0	0	1	1	1	0	1
4	0	1	1	1	1	0	1	0
5	1	0	1	1	1	1	1	1
6	0	0	1	1	1	1	0	1
7	0	1	1	1	1	1	1	0
8	0	0	1	1	1	1	1	0
Total	2	3	7	8	8	7	5	4
Prom.	2.5		7.5		7.5		4.5	

NÚMERO DE EXPLANTES MUERTOS

T R A T A M I E N T O S								
Repet.	A		B		C		D	
	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 1	Repl. 2	Repl. 1	Repl. 2	Repl.1	Repl. 2
1	1	0	0	0	0	0	1	1
2	1	1	0	0	0	0	0	0
3	0	1	1	0	0	0	1	0
4	1	0	0	0	0	0	0	1
5	0	1	0	0	0	1	0	0
6	1	1	0	0	0	0	1	0
7	1	0	0	0	0	0	0	1
8	1	1	0	0	0	0	0	1
Total	6	5	1	0	0	0	3	4
Prom.	5.5		0.5		0.5		3.5	

Anexo 11. Análisis de varianza del número de explantes vivos, en la etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”,

Título: Etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”.

Variabes: Número de explantes vivos

Repeticiones: 1 al 8

Factor de corrección: 15.125

Suma de cuadrado totales: 3.719

Suma de cuadrado de tratamientos: 2.25

Suma de cuadrado del error experimental: 1.469

TABLA DE ANALISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. medios	Fc.	Ft.	
					0.05	0.01
Tratamientos	(t-1)= 3	2.25	0.75	14.28	2.95	4.57
E. experimental	T(r-1)= 28	1.469	0.0524			
Total	(n-1)= 31	3.719				

Nota: Si Fc es mayor que Ft. Hay diferencias significativas entre los tratamientos

Coefficiente de variación: 33.29%

Anexo 12. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de explantes vivos en la etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”.

Título: Etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”

Variabes: Número de explantes vivos

Error standard: 0.080

P	2	3	4
RES	2.90	3.04	3.13
RMS	0.232	0.243	0.25

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los tratamientos ordenados de menor a mayor.**

—	—	—	—
A	D	C	B
0.3125	0.5625	0.9375	0.9375

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

—	—	—	—
A	D	C	B
—————			

Nota: Los tratamientos unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.

Anexo 13. Análisis de varianza del número de explantes muertos en la etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”

Título: Etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”.

Variables: Número de explantes muertos

Repeticiones: 1 al 8

Factor de corrección: 3.125

Suma de cuadrado totales: 3.875

Suma de cuadrado de tratamientos: 2.25

Suma de cuadrado del error experimental: 1.625

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. medios	Fc.	Ft.	
					0.05	0.01
Tratamientos	(t-1)= 3	2.25	0.75	12.93	2.95	4.57
E. experimental	T(r-1)= 28	1.625	0.058			
Total	(n-1)= 31	3.719				

Nota: Si Fc es mayor que Ft. Hay diferencias significativas entre los tratamientos

Coefficiente de variación: 77%

Anexo 14. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de explantes muertos en la etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”.

Título: Etapa de establecimiento del cultivo “in vitro”.

Variables: Número de explantes muertos

Error standard: 0.0851

P	2	3	4
RES	2.90	3.04	3.13
RMS	0.2467	0.2587	0.2663

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los tratamientos ordenados de menor a mayor.**

—	—	—	—
B	C	D	A
0.0625	0.0625	0.4375	0.6875

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

—	—	—	—
B	C	D	A
—————		—————	

Nota: Los tratamientos unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.

Anexo 15. Análisis de varianza de la producción de brotes del híbrido FHIA-21 en la etapa de multiplicación.

Título: Etapa de multiplicación.

Variabes: Número de brotes producidos hasta la sexta división

Repeticiones: 1 al 4

Factor de corrección: 800372.04

Suma de cuadrado totales: 9301070.81

Suma de cuadrado de tratamientos: 2275033.71

Suma de cuadrado de los bloques: 1732183.79

Suma de cuadrado del error experimental: 5293835.31

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. Medios	Fc.	Ft.	
					0.05	0.01
Tratamientos	(t-1)= 15	2275033.71	151668.91	1.71	1.81	2.32
Bloques	(r-1)= 4	1732183.79	433074.36	4.9	2.52	3.65
E. experiment	(t-1)(r-1)= 60	52933853.31	88230.88			
Total	(n-1)= 79	9301070.81				

Nota: Si valor Fc de los tratamientos es menor que el Ft., no hay diferencias significativas entre los tratamientos, mientras que el valor de Fc de los bloques es mayor que el Ft, hay diferencias entre los bloques.

Anexo 16. Prueba de Rango Múltiple de Duncan para el número de brotes desarrollados en la etapa de multiplicación.

Título: Etapa de multiplicación

Variabes: Número de brotes producidos hasta la sexta división.

Error standard: 74.25

P	2	3	4	5
RES	2.83	2.97	3.08	3.14
RMS	210.15	221.29	228.71	233.17

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los bloques (divisiones) ordenados de menor a mayor.**

_____	_____	_____	_____	_____
D 1-2	D 2-3	D 3-4	D 4-5	D 5-6
1.73	5.69	19.19	85.44	388.04

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

_____	_____	_____	_____	_____
D 1-2	D 2-3	D 3-4	D 4-5	D 5-6

Nota: Los bloques (divisiones) unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.

Anexo 17. Análisis de varianza de la tasa de multiplicación de *Musa balbisiana*, híbrido FHIA-21 en la etapa de multiplicación.

Título: Etapa de multiplicación.

Variables: Número de brotes por explantes

Repeticiones: 1 al 4

Factor de corrección: 415.18

Suma de cuadrado totales: 239.74

Suma de cuadrado de tratamientos: 199.92

Suma de cuadrado de los bloques: 9.15

Suma de cuadrado del error experimental: 30.66

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. Medios	Fc.	Ft.	
					0.05	0.01
Tratamientos	(t-1)= 15	199.92	13.32	26	1.81	2.32
Bloques	(r-1)= 4	9.15	2.28	4.47	2.52	3.65
E. experiment	(t-1)(r-1)= 60	30.66	0.51			
Total	(n-1)= 79	239.74				

Nota: Si valor Fc de los tratamientos y bloques es mayor que el Ft., hay diferencias significativas entre los tratamientos y los bloques.

Coefficiente de variación: 23.27%

Anexo 18. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para la tasa de multiplicación de los explantes.

Prueba de Rango Múltiple para los tratamientos.

Título: Etapa de multiplicación ²

Variables: Número de brotes por explantes

Error standard: 0.319

P	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
RES	2.83	2.98	3.08	3.14	3.2	3.24	3.28	3.31	3.33	3.33	3.37	3.37	3.4	3.4	3.43
RMS	0.9	0.95	0.98	1.0	1.02	1.03	1.04	1.058	1.064	1.064	1.077	1.077	1.087	1.087	1.096

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los tratamientos ordenados de menor a mayor.**

A	B	C	D	H	E	G	I	F	L	LI	Ñ	N	J	M	K
0	0	0	0	1.5	1.8	2.1	2.4	2.75	2.85	2.85	3.2	3.55	4.15	4.3	5

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

A	B	C	D	H	E	G	I	F	L	LI	Ñ	N	J	M	K

Nota: Los tratamientos unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.

Prueba de Rango Múltiple para las divisiones.

Título: Etapa de multiplicación

Variables: Número de brotes por explantes

Error standard: 0.178

P	2	3	4	5
RES	2.83	2.97	3.08	3.14
RMS	0.407	0.532	0.55	0.561

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los bloques (divisiones) ordenados de menor a mayor.**

_____	_____	_____	_____	_____
D 1-2	D 3-4	D 2-3	D 5-6	D 4-5
1.73	2.09	2.31	2.60	2.64

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

_____	_____	_____	_____	_____
D 1-2	D 3-4	D 2-3	D 5-6	D 4-5

Nota: Los bloques (divisiones) unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.

Anexo 19. Análisis de varianza del número promedio de hojas por explantes en la sexta división de la etapa de multiplicación de *Musa balbisiana*, híbrido FHIA-21.

Título: Etapa de multiplicación.

Variabes: Número de hojas por explantes

Repeticiones: 1 al 4

Factor de corrección: 221.26

Suma de cuadrado totales: 155.74

Suma de cuadrado de tratamientos: 111.49

Suma de cuadrado de los bloques: 2.42

Suma de cuadrado del error experimental: 41.83

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. Medios	Fc.	Ft.	
					0.05	0.01
Tratamientos	(t-1)= 15	111.49	7.43	7.99	1.92	2.53
Bloques	(r-1)= 3	2.42	0.80	0.86	2.82	4.26
E. experiment	(t-1)(r-1)= 45	41.83	0.92			
Total	(n-1)= 63	155.74				

Nota: El valor Fc de los tratamientos es mayor que el Ft., hay diferencias significativas entre los tratamientos. El valor Fc de los bloques es menor que el Ft., no hay diferencias significativas entre los bloques.

Coefficiente de variación: 38.68%

Anexo 20. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número de hojas por explantes en la sexta división de la etapa de multiplicación.

Prueba de Rango Múltiple para los tratamientos.

Título: Etapa de multiplicación

Variables: Número de hojas por explantes

Error standard: 0.48

P	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
RES	2.86	3.01	3.1	3.17	3.22	3.27	3.3	3.33	3.35	3.35	3.39	3.39	3.42	3.42	3.44
RMS	1.37	1.45	1.49	1.52	1.55	1.57	1.59	1.60	1.61	1.61	1.63	1.63	1.64	1.64	1.65

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los tratamientos ordenados de menor a mayor.**

A	B	C	D	E	I	H	G	Ñ	J	L	M	F	K	LI	N
0	0	0	0	1.25	1.5	1.75	2.0	2.0	2.25	2.25	2.5	3.25	3.25	3.25	4.5

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

A	B	C	D	E	I	H	G	Ñ	J	L	M	F	K	LI	N
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	---

Nota: Los tratamientos unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.

Anexo 21. Análisis de varianza del número promedio de raíces producida en cada tratamiento, durante la etapa de enraizamiento.

Título: Etapa de enraizamiento.

Variabes: Número de raíces por explantes

Repeticiones: 1 al 5

Factor de corrección: 498.81

Suma de cuadrado totales: 646.19

Suma de cuadrado de tratamientos: 247.59

Suma de cuadrado de los bloques: 9.94

Suma de cuadrado del error experimental: 388.66

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. Medios	Fc.	Ft.	
					0.05	0.01
Tratamientos	(t-1)= 11	247.59	22.5	2.54	2.01	2.63
Bloques	(r-1)= 4	9.94	2.485	0.28	2.58	3.78
E. experiment	(t-1)(r-1)= 44	388.66	8.833			
Total	(n-1)= 59	646.19				

Nota: El valor Fc de los tratamientos es mayor que el Ft., por tal razón, hay diferencias significativas entre los tratamientos. El valor Fc de los bloques es menor que el Ft., por tal motivo, no hay diferencias significativas entre los bloques.

Coefficiente de variación: 85.98%

Anexo 22. Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para el número promedio de raíces producida por cada tratamiento en la etapa de enraizamiento.

Prueba de Rango Múltiple para los tratamientos.

Título: Etapa de enraizamiento

Variables: Número de raíces por explantes

Error standard: 1.329

P	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RES	2.86	3.01	3.1	3.17	3.22	3.27	3.3	3.33	3.35	3.35	3.39
RMS	3.08	4.0	4.11	4.21	4.27	4.34	4.38	4.42	4.45	4.45	4.5

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los tratamientos ordenados de menor a mayor.**

B	C	A	F	K	D	L	J	H	I	G	E
0	0	0.4	0.8	2.2	2.4	3.4	4.2	4.6	5.0	5.6	6.0

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

B	C	A	F	K	D	L	J	H	I	G	E
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Nota: Los tratamientos unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.

Anexo 23. Análisis de varianza de la longitud promedio de las raíces, en la etapa de enraizamiento.

Título: Etapa de enraizamiento.

VARIABLES: Longitud de las raíces

Repeticiones: 1 al 5

Factor de corrección: 65.01

Suma de cuadrado totales: 97.9

Suma de cuadrado de tratamientos: 44.35

Suma de cuadrado de los bloques: 1.639

Suma de cuadrado del error experimental: 51.9

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Suma de C. Medios	Fc.	Ft.	
					0.05	0.01
Tratamientos	(t-1)= 11	44.352	4.032	3.41	2.01	2.63
Bloques	(r-1)= 4	1.639	0.409	0.346	2.58	3.78
E. experiment	(t-1)(r-1)= 44	51.9	1.17			
Total	(n-1)= 59	97.9				

Nota: El valor Fc de los tratamientos es mayor que el Ft., por tal razón, hay diferencias significativas entre los tratamientos. El valor Fc de los bloques es menor que el Ft., por tal motivo, no hay diferencias significativas entre los bloques.

Coefficiente de variación: 78.38%

Anexo 24. . Prueba de Rango Múltiple de Duncan, para la longitud promedio de las raíces en la etapa de enraizamiento.

Prueba de Rango Múltiple para los tratamientos.

Título: Etapa de enraizamiento

Variables: Longitud de las de raíces

Error standard: 0.483

P	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
RES	2.86	3.01	3.1	3.17	3.22	3.27	3.3	3.33	3.35	3.35	3.39
RMS	1.38	1.45	1.49	1.53	1.55	1.58	1.59	1.61	1.62	1.62	1.63

P: Número de medias para el rango probado.

RES: Rango Estandarizado Significativo.

RMS: Rango Mínimo Significativo.

*** Media de los tratamientos ordenados de menor a mayor.**

A	B	C	K	F	L	H	I	D	E	G	J
0	0	0	0.38	0.8	0.86	0.92	0.94	1.2	1.62	2.32	

*** Resultados comparados mediante la notación de Duncan**

A	B	C	K	F	L	H	I	D	E	G	J
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Nota: Los tratamientos unidos por la misma líneas son estadísticamente iguales, es decir, no presentan diferencias significativas.