

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCIÓN GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE POSGRADO

Estudio de la anatomía y morfología vegetativas de plantas
de Musa in vitro, en condiciones de
aclimatación y en el campo

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico
Académico del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias
Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico
Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado
de .

Magister Scientiae

por

Jorge Arturo Sandoval Fernández

CATIE
Turrialba, Costa Rica
1989

Esta tesis ha sido aceptada en su forma presente por la
Comisión de Estudios de Posgrado del CATIE como requisito
para optar al grado de

Magister Scientiae

COMITE ASESOR:


Ludwig Müller, Ph.D.

Profesor Consejero


Victor Vidalobos, Ph.D.


Miembro del Comité


José Galindo, Ph.D.

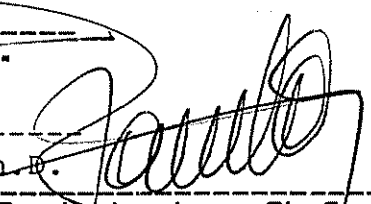
Miembro del Comité


Carlos Ramírez, Ph.D.

Miembro del Comité


Ramiro Jaramillo, Ph.D.

Miembro del Comité


Ramón Lastra, Ph.D.,
Coordinador del Programa de Estudios de Posgrado


Jorge Arturo Sandoval Fernández
Postulante


Dr. José Luis Parisí
Subdirector General Adjunto de Enseñanza

A MARIA FERNANDA Y DIANA CATALINA
A MI ESPOSA ANA GRACE

AGRADECIMIENTOS

Expreso gratitud al Dr. Ludwig E. Müller por sus enseñanzas, estímulo para continuar con mis estudios y por su colaboración y dedicación durante este trabajo.

Al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) por conferirme la oportunidad de realizar estudios de posgrado.

A los miembros del Comité Asesor por sus valiosas sugerencias durante la revisión del manuscrito borrador.

Al Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID) y a la Agencia Internacional para el Desarrollo (AID-Science) por brindar el apoyo financiero para la realización de la investigación.

A la Sra. Ana Cecilia Guerrero Vargas por su anuencia desinteresada, paciencia con mis manuscritos y por su acertado trabajo de digitación.

A la Lic. Biol. Nelly Vásquez M. por sus atinadas sugerencias, ayuda profesional y su amistad.

Al Ing. Ramiro Jaramillo C. por su atención en el derrotero profesional del graduando, su apoyo y colaboración.

A la Dra. Eugenia M. Flores por su interés en la realización del estudio y cooperación.

Al Prof. Dr. F. Weberling de la Universidad de Ulm, Alemania Federal y, a su personal por su interés y ayuda.

A María E. Aguilar, Ana C. Tapia, Silvana Alvarenga, Lissette Vega, Maritza Loaiza, Vilma Jiménez y, a todas y cada una de las personas que trabajan en el Laboratorio Cultivo de Tejidos, que con su compañerismo, propician lazos de impercedera amistad.

Gracias.

BIOGRAFIA

El autor, de nacionalidad costarricense, nació en Turrialba, Provincia de Cartago, el 26 de marzo de 1958. Realizó sus estudios de Educación Secundaria en el Colegio Clodomiro Picado T. y los de Educación Superior en la Universidad de Costa Rica (Escuela de Agronomía del Atlántico), de la cual egresó en 1985.

En 1986 ingresó al Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE, egresando en marzo de 1988. Además, ha realizado cursos de especialización en el área de cultivo de tejidos y ha sido instructor en otros similares.

Inició sus actividades laborales en CATIE en 1984 y actualmente trabaja en el Programa I, Mejoramiento de Cultivos Tropicales.

CONTENIDO

	<u>Página</u>
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Biografía.....	vi
Resumén.....	ix
Summary.....	xii
Lista de Figuras.....	xiv
Lista de Cuadros.....	xxvi
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1. Origen.....	3
2.2. Clasificación taxonómica.....	3
2.3. Aspectos morfológicos y anatómicos.....	4
2.3.1. Hoja.....	6
2.3.2. Cormo y brotación lateral.....	14
2.3.3. Sistema radical.....	20
2.3.4. Meristema apical.....	26
2.3.5. Flores e inflorescencia.....	29
2.3.6. Fruto.....	32
2.4. Técnicas de propagación <u>in vivo</u>	33
2.5. Técnicas de propagación <u>in vitro</u>	34
2.6. Aclimatación o endurecimiento de las plantas...	38
2.7. Cambios <u>in vitro</u> y durante la aclimatación.....	40
3. MATERIALES Y METODOS.....	46
3.1. Material vegetal estudiado.....	46
3.1.1. Especies, cultivares y genoma.....	46
3.1.2. Cultivo <u>in vitro</u>	46
3.1.3. Aclimatación.....	50
3.1.4. Material de campo.....	51
3.2. Preparación del material y observaciones morfológicas y anatómicas.....	51
3.2.1. Cortes frescos.....	51
3.2.2. Preparaciones semipermanentes.....	52
3.2.3. Preparaciones permanentes.....	53
3.2.4. Diafanización de hojas y observación de estomas.....	57
3.2.5. Microscopía óptica.....	57
3.2.6. Microscopía electrónica de barrido.....	58

4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	59
4.1. Plantas <u>in vitro</u>	59
4.1.1. Morfología y anatomía de raíces.....	59
4.1.2. Morfología y anatomía del cormo.....	73
4.1.3. Morfología y anatomía de hojas.....	73
4.2. Plantas en aclimatación.....	87
4.2.1. Morfología y anatomía de raíces.....	87
4.2.2. Morfología y anatomía del cormo.....	91
4.2.3. Morfología y anatomía de hojas.....	92
4.3. Plantas en campo.....	104
4.3.1. Morfología y anatomía de raíces.....	106
4.3.2. Morfología y anatomía del cormo.....	113
4.3.3. Morfología y anatomía de hojas y vaina.....	122
5. CONCLUSIONES.....	161
6. RECOMENDACION.....	165
7. LITERATURA CITADA.....	166

RESUMEN

Se estudió, en forma comparativa, la morfología y anatomía de plantas de Musa spp. micropropagadas, en aclimatación y adultas en el campo. Se encontraron diferencias muy marcadas entre los tres tipos de planta con respecto a los tres órganos estudiados (raíz, cormo, hoja). La hoja in vitro se asemeja a una hoja normal (también a una de Musa balbisiana recién germinada), a veces con hipodermis doble y poca diferenciación entre el parénquima empalizada y el esponjoso. Se observó muy poca cera encima de la cutícula que es muy fina. No existe un pecíolo pronunciado y las vainas foliares encierran al cormo, el cual es pequeño. La nervación es paralela en la mitad superior de los semilimbos. El tallo consiste de un cormo erecto, con un recorrido en su interior de los haces vasculares aparentemente muy irregular y en todas las direcciones. El meristema apical tiene la forma típica, envuelto en las bases de los primordios foliares. Las raíces son largas, poco ramificadas, con pelos absorbentes persistentes cuando no están inmersas dentro del agar. La caliptra está formada por un caliptrógeno bien definido; contiene granos de almidón como estatolitos.

Durante la etapa de aclimatación se presentan ciertos cambios, a veces en pasos intermedios, al formarse las nuevas hojas. Así las hojas, que muestran el fenómeno de gutación a través de heridas, tienen una cutícula más gruesa

y cada vez mayor cantidad de cera epicuticular. A partir de la octava hasta la décima hoja formada, aparecen alvéolos en el interior del parénquima esponjoso, que luego queda como un tapete. El tallo, en forma de un cormo erecto, tiene en su parte apical el meristema y en su base nacen raíces largas, con pelos absorbentes. Durante este período la caliptra es más grande y es mayor la zona de estatolitos.

Las plantas en el campo muestran hojas más gruesas y predominan alvéolos grandes en el parénquima esponjoso, cuyos límites, en forma de hacecillos conductores, le confieren a la hoja un aspecto de compartimentalización. La hipodermis consta de uno o más comúnmente de dos estratos, pero a veces su número es mayor. La cutícula es gruesa, con abundante cera epicuticular. La nervación secundaria es paralela, partiendo en ángulo agudo de la nervadura central; existe el mismo esquema en las hojas espada, contrario a la hoja in vitro. El peciolo tiene estructura intermedia entre la de la vaina y la de la lámina. El tallo vegetativo consta de un cormo vertical que lleva en su parte superior las vainas foliares y en la parte inferior las raíces. El cormo es de crecimiento simpodial, con cada yema terminal en posición final lateralmente opuesta a la base foliar (vainas); sin embargo se mantiene la filotaxia. Los hijuelos, de estructura simpodial idéntica, se derivan de las yemas terminales laterales. Al iniciarse la floración el crecimiento del tallo cambia a monopodial,

con una inflorescencia indeterminada. El sistema radical es una homorrizia secundaria típica, de raíces poliarcas, con engrosamiento en el cilindro central y espacios aeríferos en la parte central de la corteza.

SUMMARY

The morphology and anatomy of Musa spp. plants micropropagated, in acclimatation and in the field, were compared. Marked differences could be detected between the three types of plants regarding their three organs (root, leaf, stem). The in vitro leaf resembles a typical leaf (and similar to one of a recently germinated Musa balbisiana plantlet), with a double epidermis (hypodermis), little differentiation between palisade and spongy parenchyma. There exists little epicuticular wax and the cuticle is very thin. The nervation, in the upper half, is parallel. There exists no real petiole and the leaf sheaths surround the small corm. The stem consists of a small vertical corm, with an apparently very irregular pattern of the distribution of the vascular bundles in all directions. The apical meristem has a typical form and is enclosed by the bases of the leaf primordia. The roots are long, little branched, with abundant persistent root hairs when not submersed in agar. The calyptra, formed by a well defined calyptragen, contains starch grains as statoliths.

During acclimatation certain changes become evident, sometimes as intermediary steps when new leaves are formed. The leaves, which show guttation through wounds, have a thicker cuticle and each time more wax deposits. Starting with the eighth to tenth leaf formed, large air spaces appear in the spongy parenchyma, the cells of which are

reduced to a tapetum inside the cavities. The stem is represented by an erect corm which has in its apical part the meristem, and in its base the roots originate. These are long, with root hairs and a large calyptra with a more extensive zone with statoliths.

In field-grown plants the leaves are much thicker, with a predominance of large air spaces in the spongy parenchyma. These spaces are limited by the veins, thus giving an aspect of innumerable compartments as in a checkboard. The adaxial hypodermis is formed by one, more often by two but also by several cell layers. The cuticle is thick, with abundant wax deposits. All secondary veins rise from the midrib in an acute angle, with the same scheme realized in the sword leaves, contrary to those in vitro. The petiole has an intermediate structure between the leaf sheath and the blade. The vegetative stem consists of a sympodial corm, with each terminal bud in a final position opposite to the sheath insertion, but following leaf disposition. The suckers, also of identical sympodial structure, originate from the laterally positioned terminal buds. When flowering is initiated the growth of the stem becomes monopodial, with an indeterminate inflorescence. The root system is typically secondary homorhizic. The polyarc roots show thickening of the central cylinder and air spaces in the center part of the cortex.

LISTA DE FIGURAS

En el texto:	Página
Figura 1. Esquema de una planta de <u>Musa</u> en fructificación con sus rebrotes y detalle de las hojas (según Champion, 1968).....	5
Figura 2. Parte basal de una planta <u>in vitro</u> con seis semanas de incubación mostrando la inserción de sus raíces adventicias en la parte inferior del cormo (cv. Gran Enano).....	61
Figura 3. Sección transversal de una raíz joven (tetrarca) <u>in vitro</u> desarrollada fuera del medio semisólido (cv. Gran Enano).....	62
Figura 4. Corte transversal de una raíz poliarca casi madura de una planta <u>in vitro</u> desarrollada en medio semisólido (cv. Gran Enano).....	64
Figura 5. Parte proximal de una raíz vieja (gruesa) de una planta <u>in vitro</u> desarrollada en medio semisólido mostrando aerénquima lisígeno (cv. Gran Enano).....	66
Figura 6. Iniciación de una raíz lateral en el cormo de una planta <u>in vitro</u> (cv. Falso Cuerno).....	67
Figura 7. Raíz lateral formada en el cormo de una planta <u>in vitro</u> perforando la base (vaina) de una hoja (cv. Falso Cuerno).....	67
Figura 8. Sección longitudinal del ápice de una raíz de una planta <u>in vitro</u> (cv. Falso Cuerno).....	70

Figura 9.	Corte longitudinal a través de la parte apical del cormo de una planta <u>in vitro</u> , indicando las bases foliares, las ramificaciones y el recorrido de los haces vasculares con los rastros foliares (cv. Falso Cuerno).....	71
Figura 10.	Corte transversal de la parte central del cormo de una planta <u>in vitro</u> indicando la distribución de los haces vasculares (cv. Pelipita).....	72
Figura 11.	Corte longitudinal por el ápice de una planta <u>in vitro</u> (cv. Falso Cuerno).....	72
Figura 12.	Planta <u>in vitro</u> desarrollada en un medio semisólido con una concentración de citocinina baja (0,5 mg/l) (cv. Falso Cuerno).....	74
Figura 13.	Hoja completamente desarrollada de una planta <u>in vitro</u> con la nervación típica (cv. Falso Cuerno).....	74
Figura 14.	Planta <u>in vitro</u> desarrollada en un medio semisólido a las cuatro semanas de incubación con una concentración de citocinina alta (4 mg/l) (cv. Falso Cuerno).....	75
Figura 15.	Dibujo esquemático de la relación entre la nervación (Ne) y orientación de las células epidermales correspondientes (Ep) en una hoja <u>in vitro</u>	77
Figura 16.	Borde de una hoja completamente desarrollada hoja de una planta <u>in vitro</u> formada en un medio semisólido con una concentración de citocinina alta (4mg/l)(cv. Falso Cuerno).....	77
Figura 17.	Corte transversal de una hoja completamente desarrollada de una planta <u>in vitro</u> formada en un medio con una concentración de citocinina alta (4 mg/l)(cv. Falso Cuerno).....	79

Figura 18. Corte transversal de una hoja completamente desarrollada de una planta in vitro formada en un medio con una concentración de citocinina relativamente baja (1 mg/l) (cv. Falso Cuerno)..... 79

Figura 19. Superficie foliar (lado abaxial) de una hoja desarrollada en condiciones in vitro. La superficie estriada de las células epidermales muestra muy poca presencia de cera epicuticular (cv. Gran Enano)..... 80

Figura 20. Corte transversal de la región de la vena central de una hoja in vitro completamente desarrollada. En la vena central se observan alvéolos recubiertos de parénquima esponjoso (cv. Falso Cuerno)..... 81

Figura 21. Forma de las células epidermales y distribución de estomas en el énvés de una hoja in vitro completamente desarrollada (cv. Falso Cuerno)..... 83

Figura 22. Forma de las células epidermales y distribución de estomas en la haz de una hoja in vitro completamente desarrollada (cv. Falso Cuerno)..... 83

Figura 23. Esquema de la orientación de la células epidérmicas (Ep) e hipodérmicas (Hi) en el lado abaxial de una hoja in vitro..... 84

Figura 24. Esquema de la orientación de las células de la epidermis superior y de la hipodermis cerca de la nervadura central en una hoja in vitro..... 84

Figura 25. Sistema radical de una planta cuatro meses después de su trasplante a suelo (cv. Falso Cuerno)..... 85

Figura 26. Diagrama del ápice de una raíz en aclimatación con la zona de estatolitos muy desarrollada.....	89
Figura 27. Corte longitudinal de la parte externa de una raíz de una planta con cuatro meses de aclimatación por la zona de transición entre cofia e iniciación de pelos absorbentes (cv. Falso Cuerno).....	90
Figura 28. Superficie foliar (lado adaxial) de una hoja desarrollada durante la etapa de aclimatación. Se observa en la superficie epidermal una mayor deposición de cera epicuticular que <u>in vitro</u> (cv. Gran Enano).....	95
Figura 29. Hoja completamente desarrollada de una planta con tres meses de aclimatación con la nervación típica (cv. Falso Cuerno).....	95
Figura 30. Corte transversal de una hoja completamente desarrollada que corresponde a la fase de transición con un haz vascular sencillo. En el alvéolo izquierdo se aprecia el parénquima esponjoso en el fondo (cv. Falso Cuerno).....	97
Figura 31. Corte transversal de la misma hoja que en Figura 30 con un hacecillo vascular más desarrollado e idioblasto con rafidios	98
Figura 32. Corte transversal de una hoja completamente desarrollada que presenta la transición de un hacecillo vascular muy sencillo (cv. Falso Cuerno).....	99
Figura 33. Corte transversal de la misma hoja que en Figura 32 donde se observa un hacecillo fibrovascular de mayor desarrollo.....	99

Figura 34. Corte transversal por una vena principal lateral, cerca de la nervadura central de una hoja de una planta con nueve meses de aclimatación con hipodermis superior atípica (cv. Falso Cuerno).....	101
Figura 35. Corte paradermal de una hoja completamente desarrollada de una planta con dos meses de aclimatación a la altura del parénquima esponjoso. Todavía no se observa la estructura alveolar (cv. Falso Cuerno).....	102
Figura 36. Corte longitudinal de parte del xilema en el extremo distal del haz concentrico de una raíz de una planta adulta. El lúmen de la tráquea aparece a la izquierda y las traqueidas y células acompañantes a la derecha (cv. Pelipita).....	105
Figura 37. Corte transversal de la parte interna de una raíz madura en una planta adulta (cv. Pelipita).....	107
Figura 38. Detalle de un corte transversal de una raíz adulta a través de la endodermis.....	108
Figura 39. Vista lateral de un segmento de una tráquea de una raíz adulta. Se aprecian los engrosamientos de la tráquea y de las paredes perpendiculares con los poros de las células que la rodean. Para mayor comprensión se han eliminado todas las demás paredes de las células circundantes (cv. Valery).....	109
Figura 40. Corte transversal de una tráquea en una raíz madura que corresponde a la Figura 39.....	109

Figura 41. Aspecto tridimensional de un segmento de tráquea de una raíz adulta que corresponde a las Figuras 39 y 40. Se aprecian los engrosamientos de la tráquea y de las paredes perpendiculares de las células que la rodean. Para mayor comprensión se han eliminado las demás paredes de las células circundantes.....	110
Figura 42. Cormo horizontal de un hijuelo de <u>M.textilis</u> . En la parte central se ha expuesto la estructura interna de la corteza mediante un corte superficial, mostrando la disposición de nudos y entrenudos. Parte de las raíces fueron eliminadas para una mayor comprensión.....	114
Figura 43. A) Esquema de un ripidio; H hoja; Y yema correspondiente. 1 a 7 hojas y yemas correspondientes sucesivas	
B) Esquema de la disposición de las hojas y yemas en un cormo de <u>Musa</u> . H hoja, Y yema correspondiente, 1 a 7 hojas y yemas correspondientes sucesivas. Como disposición foliar se asumió 3/7 lo que da un ángulo de divergencia de 154°.....	115
Figura 44. Vista de una yema lateral cubierta por los extremos superpuestos de la vaina circundante. La vaina debajo de la yema fue removida (cv. Pelipita).....	116
Figura 45. Vista de la misma yema lateral que en Figura 44 después de la remoción de los extremos superpuestos de la vaina circundante.....	117
Figura 46. Vista de una yema lateral que no está cubierta por los extremos de la vaina. La vaina debajo de la yema fue removida y se aprecian los haces vasculares cortados (cv. Pelipita).....	117

Figura 47. Parte basal de una hoja de espada muy joven (12 mm ancho) con su nervación típica y la asimetría de los semilimbos (cv. Gros Michel).....	119
Figura 48. Parte basal de una hoja de espada joven con su nervación típica y asimetría de los semilimbos (cv. Gros Michel).....	119
Figura 49. Asimetría basal de la hoja en <u>Musa balbisiana</u>	120
Figura 50. Corte transversal de una hoja de espada completamente desarrollada con lámina reducida (10 mm de ancho) a través de la región donde existe en una hoja normal la banda pulvinular (cv. Gros Michel).....	120
Figura 51. Corte transversal de una hoja de espada completamente desarrollada con lámina reducida (20 mm ancho) (cv. Gros Michel).....	123
Figura 52. Hoja adulta antes de desenrollarse completamente con el ápice todavía intacto.....	123
Figura 53. Dibujo esquemático de las posibilidades de reducción (o aumento) del número de venas secundarias.....	125
Figura 54. Borde foliar de una hoja adulta con el margen necrosado (cv. Pelipita).....	127
Figura 55. Corte transversal de una hoja adulta (nomófilo) (cv. Pelipita).....	128
Figura 56. Corte paradermal cerca de la epidermis inferior de una hoja adulta con compartimentalización debida a los tabiques separatorios (cv. Gran Enano).....	129

Figura 57. Corte paradermal de la misma hoja que en Figura 56 a la altura de los haces vasculares en los tabiques (interconexión xilemática).....	130
Figura 58. Corte paradermal de la misma hoja que en Figura 56 debajo de los haces vasculares en los tabiques transversales.....	130
Figura 59. Corte transversal de una hoja adulta a la altura de un tabique longitudinal. La parte xilemática del hacecillo vascular del tabique transversal está conectada por traqueidas con el hacecillo vascular del tabique (cv. Gran Enano).....	132
Figura 60. Corte transversal de una hoja adulta con células del parénquima esponjoso atravesando los alvéolos (cv. Gros Michel).....	134
Figura 61. Corte transversal de la parte superior de una hoja adulta con hipodermis irregular (cv. Pelipita).....	135
Figura 62. Corte transversal de la parte superior de una hoja adulta con hipodermis superior múltiple (cv. Pelipita).....	135
Figura 63. Epidermis superior con tres estratos de hipodermis en una hoja adulta (cv. Gran Enano).....	136
Figura 64. Corte transversal del lado abaxial de una hoja con la cavidad subestomática extendiéndose hasta el parénquima asimilador (cv. Pelipita).....	136

Figuras 65-66-67-68. Esquema de la orientación de las células de la epidermis superior (65), primero (66) y segundo estrato (67) de la hipodermis de una hoja adulta. Superposición de los tres estratos (68) (cv. Pelipita).....	137
Figura 69. Epidermis superior (A) e inferior (B) del borde foliar de una hoja adulta, con arreglo irregular de las células epidérmicas debido a la reducción de la superficie foliar (cv. Gran Enano).....	139
Figura 70. Esquema de la orientación de las células en la epidermis superior (A), hipodermis (B) y superposición de ambos estratos (C) de una hoja adulta (cv. Falso Cuerno).....	139
Figura 71. Hipodermis sobre una venación secundaria en una hoja adulta (cv. Gran Enano).....	140
Figura 72. Corte paradermal a través del parénquima en empalizada en una hoja adulta cerca de la epidermis superior (cv. Falso Cuerno).....	140
Figura 73. Superficie foliar (lado abaxial) de una hoja adulta desarrollada en el campo con gran cantidad de cera epicuticular, especialmente en los límites entre las células (cv. Gran Enano).....	141
Figura 74. Esquema de la distribución de estomas en el lado inferior de una hoja adulta en relación a los alvéolos.....	142
Figura 75. Esquema de un corte transversal de la nervadura central de un nomófilo, con indicación de la ubicación de la banda pulvinular (en negro). Los semi-limbo están en posición plegada.....	142

Figura 76. Esquema de un corte transversal a través de la región de la banda pulvinular.....	144
Figura 77. Corte transversal de una hoja normal (nomófilo) por la banda pulvinular (cv. Gran Enano).....	144
Figura 78. Variabilidad de la forma de los cristales encontrados en las células de diversos tejidos.....	145
Figura 79. Idioblastos (Id) con rafidios incrustados en el parénquima amiláceo en una vaina de una planta adulta. Granos de almidón (Al)(cv. Falso Cuerno).....	145
Figura 80. Idioblasto con rafidios en la nervadura central de una hoja adulta (cv. Falso Cuerno).....	147
Figura 81. Tabique transversal de la vaina de una planta adulta. Las células estrelladas contienen cristales (Cr) y granos de almidón (Al); la deformación longitudinal de las células se debe a la tensión producida al madurar la vaina (cv. Pelipita).....	147
Figura 82. Esquema de un corte longitudinal de la vaina, con tabiques longitudinales (Tl) y tabiques transversales (Tt).....	148
Figura 83. Dibujo esquemático de un corte transversal de la vaina cerca de un pecíolo (cv. Pelipita).....	148
Figura 84. Corte transversal del lado adaxial de la vaina externa de una planta adulta. En el fondo se aprecia el estoma. Las células del parénquima contienen leucoplastos con depósitos de almidón (cv. Pelipita).....	149

Figura 85. Tipología de gránulos de almidón. (cv. Pelipita).....	149
Figura 86. Corte longitudinal a través de la yema terminal de un cormo de una planta adulta con el meristema apical, la inserción de las bases foliares y una yema lateral (cv. Pelipita).....	150
Figura 87. Esquema de un corte longitudinal del cormo con el punto vegetativo casi plano.....	150
Figura 88. Esquema de un corte longitudinal del cormo con el punto vegetativo algo cónico.....	151
Figura 89. Superficie interna (adaxial) de una vainita foliar. Vista de un estoma no funcional en la epidermis poco ondulada (A). Estoma en el fondo de un hoyo (B).....	152
Figura 90. Corte longitudinal de la parte externa del cormo a través de una yema lateral (cv. Falso Cuerno).....	154
Figura 91. Esquema de un corte longitudinal a través de una yema lateral. La línea punteada indica el límite entre el cormo (Co) y yema lateral (Yl). Meristema (Me).....	155
Figura 92. Corte longitudinal a través de la región meristemática de una yema lateral (cv. Pelipita).....	154
Figura 93. Parénquima estrellado atípico (espacios aeríferos redondeados) en un peciolo de una hoja adulta. Las células estrelladas contienen gran cantidad de cristales (cv. Pelipita).....	156

Figura 94. Iniciación del tabique transversal de parénquima estrellado en el pecíolo, visto de lado (cv. Pelipita).....	156
Figura 95. Tabique transversal de un pecíolo de parénquima estrellado típico (cv. Pelipita).....	157
Figura 96. Esquema de la distribución de haces y tabiques en un pecíolo de hoja adulta.....	157

LISTA DE CUADROS

Página

En el texto:

Cuadro 1.	Medios de cultivo utilizados en las etapas de la micropropagación de <u>Musa</u>	49
Cuadro 2.	Componentes y proporciones de la gelatina glicerinada.....	53
Cuadro 3.	Concentraciones y tiempo de permanencia en TBA de los objetos fijados durante su deshidratación.....	54
Cuadro 4.	Metodología de coloración safranina-verde rápido, secuencia y tiempos de tinción.....	56

1. INTRODUCCION

El banano (Musa AAA) y el plátano (Musa AAB, ABB) constituyen una fuente alimenticia muy importante en los países tropicales productores. Además, los frutos son de gran aceptación en mercados internacionales. Su cultivo contribuye a la obtención de divisas y a la generación de empleo. Se producen en varios tipos de sistemas de agricultura tropical y subtropical, desde pequeñas hasta grandes plantaciones, generalmente como monocultivo y también en forma de cultivos en asocio (57).

La producción mundial de banano y plátano se estima en más de 60 millones de toneladas. De esta un 40% corresponde al Continente Americano en el cual la superficie cultivada se calcula en más de 1,5 millones de hectáreas (57). Por ejemplo, Costa Rica en el primer semestre de 1988 colocó en el mercado internacional 26 millones de cajas de banano (104).

Debido a que la mayoría de los tipos comestibles no producen semillas (son triploides partenocárpicos), su propagación es asexual. Los hijuelos formados en el cormo madre son separados para utilizarlos como propágulos. Sin embargo, mediante los métodos de propagación convencionales la tasa de multiplicación es baja. Recientemente la atención está enfocada en aprovechar las ventajas que presenta la metodología de propagación rápida mediante

cultivo de tejidos. El método es eficaz y consiste en cultivar asépticamente ápices provenientes de hijuelos en un medio nutritivo artificial. En otras especies (11, 26, 27) se han realizado estudios anatómicos de plantas in vitro y en algunas existen evidencias de la aparición de variantes morfológicas durante su cultivo in vitro (50, 51, 52, 53, 79, 99, 109) que difieren de plantas normales en una o varias características. Es difícil reconocer estas particularidades mientras las plántulas se encuentran en condiciones in vitro o todavía en la fase de aclimatación. No existe información sobre los patrones de desarrollo de plántulas de Musa in vitro ni de los cambios que tienen lugar durante la fase de adaptación a las condiciones de campo. Tampoco existen estudios morfológico-anatómicos exhaustivos en plantas adultas desarrolladas en el campo, que puedan servir de base para efectuar las comparaciones. Tomando en cuenta lo anterior se estimó conveniente realizar un estudio morfológico-anatómico con el objetivo de lograr una mejor caracterización de la planta de Musa al verificar si existe una influencia de las condiciones in vitro sobre la estructura y desarrollo de las plantas micropropagadas y determinar los cambios inducidos por el proceso de aclimatación a condiciones de campo. Por esta razón se utilizó también material de las especies M. acuminata, M. balbisiana, M. textilis, además de variedades y cultivares, de banano y plátano comunmente utilizados en Centroamérica para disponer de plantas en las cuales se expresaron las

características estudiadas en su mejor forma, puesto que no se trataba de establecer diferencias entre ellas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen

El Sureste Asiático es considerado el lugar de origen de Musa, sin embargo, el sitio exacto no está totalmente definido (96). Stover y Simmonds' (97) anotaron que efectivamente todas las musáceas existentes en Africa y en América se originaron en la Costa Pacífica de Asia. Estos autores sugirieron que el centro de diversidad más importante para los tipos AA, AAA es Malasia, para AB, AAB y ABB la India y para AB BB el Sureste Asiático y Papua (Nueva Guinea).

De Africa Occidental, originarios posiblemente de Nueva Guinea, se introdujeron algunos clones de Musa a Islas Canarias y luego en el año 1516 se trajeron a América (65).

2.2. Clasificación Taxonómica

De acuerdo con Simmonds (89, 90), las musáceas pertenecen a la clase de las monocotiledóneas, al orden Zingiberales y a la familia Musaceae, la cual incluye los géneros Musa y Ensete. El género Musa se divide en cuatro secciones: Australimusa, Callimusa, Rhodochlamys y Eumusa. Esta última sección comprende a las especies M. acuminata y

M. balbisiana. El número básico cromosómico para la sección Eumusa es de $n=11$. Las musáceas comestibles usualmente se dividen en dos tipos: bananos y plátanos. Tuvieron su origen en dos especies silvestres, Musa acuminata y Musa balbisiana que son diploides. La ploidia y el genomio de cada cultivar está representado con A para indicar la procedencia de Musa acuminata y con B para la de Musa balbisiana. De esta manera las letras A y B sirven para la clasificación e identificación de cultivares (97). Es posible encontrar cultivares diploides AA y triploides AAA, que son los dos tipos de banano cultivado, mientras que los plátanos son híbridos entre las dos especies ancestrales, con genoma variable (AAB, ABB)(22, 90); también existen tetraploides (AAAA).

2.3. Aspectos morfológicos y anatómicos

El banano y el plátano son plantas herbáceas perennes, de porte generalmente alto. Poseen un pseudotallo aéreo, constituido por las vainas foliares que se encuentran fuertemente imbricadas en forma helicoidal (22)(Fig. 1). El pseudotallo se origina de un cormo o tallo erecto que desarrolla hojas en la parte superior y raíces adventicias y brotes laterales en la parte inferior (22, 97). El meristema apical está localizado en el centro de la parte superior del cormo, encerrado entre las vainas foliares, creciendo en forma ascendente (ortótropa). Las hojas, a partir de su base, constan de vaina, peciolo, nervio

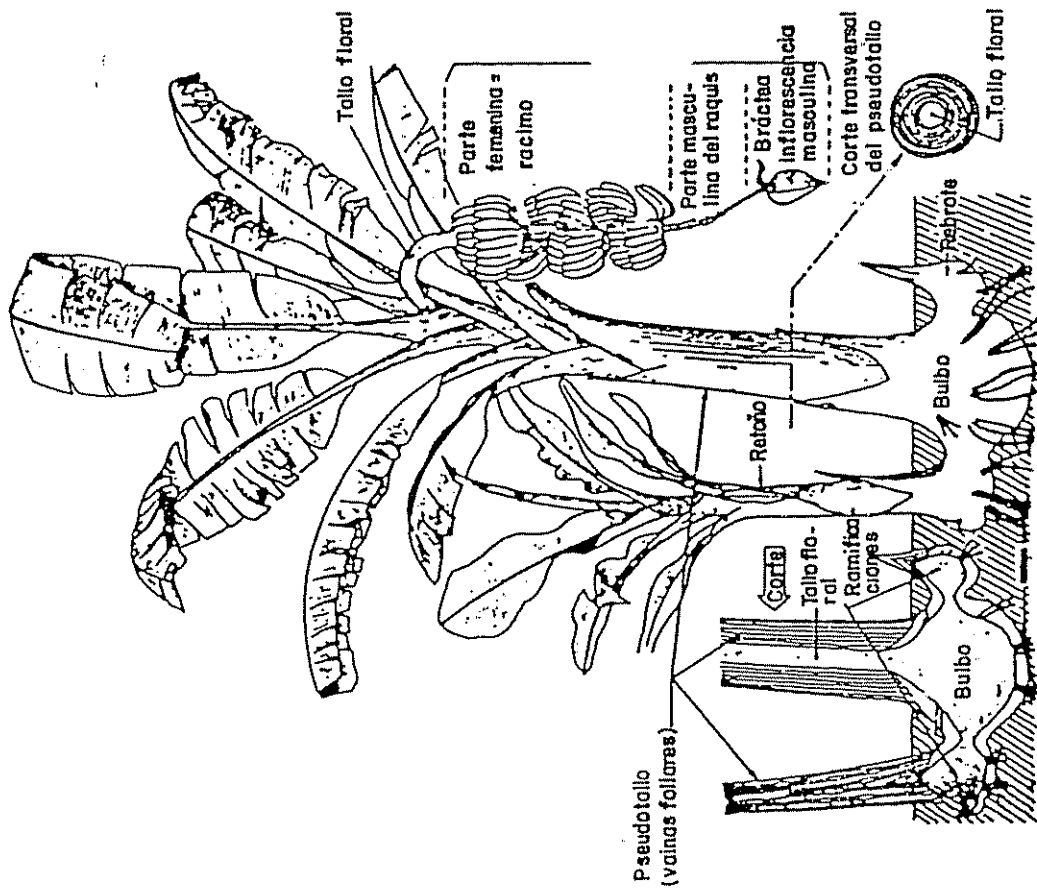
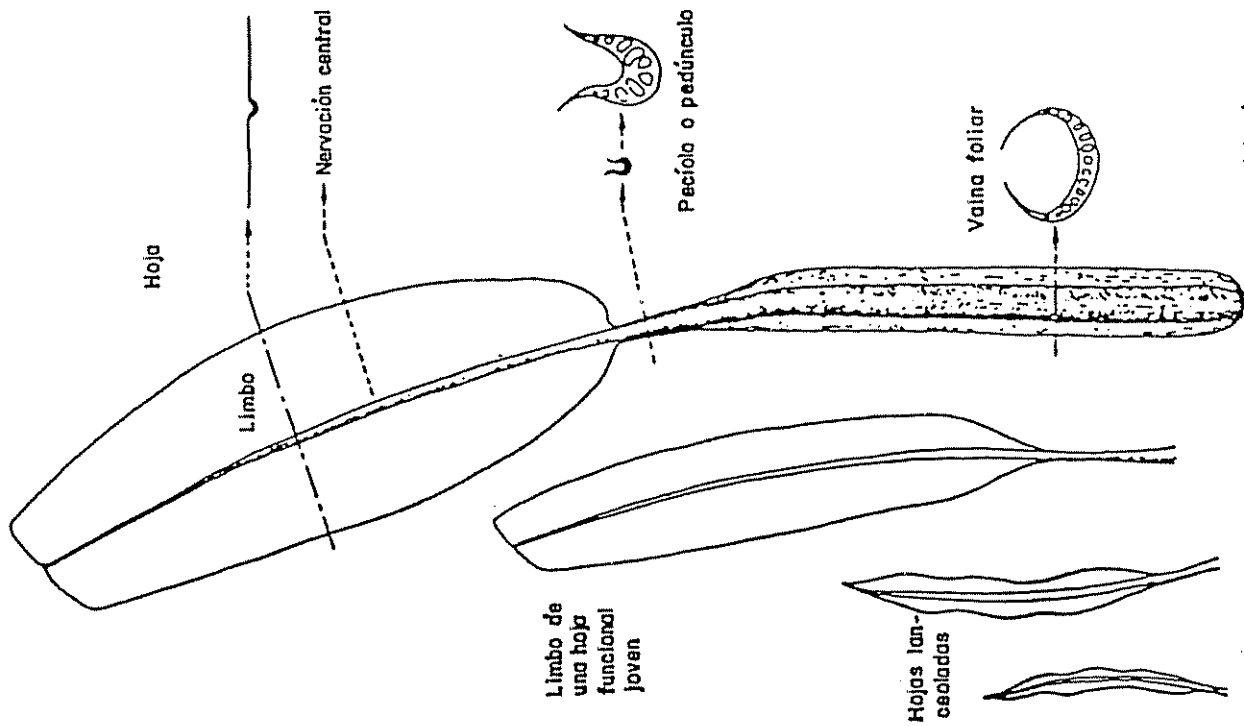


Fig. 1 Esquema de una planta de Musa en fructificación con sus rebrotes y detalle de las hojas según Champion, J. 1968 (22)

central, limbo (Fig. 1) y el apéndice (22, 96, 90). La inflorescencia terminal crece a través del pseudotallo. Generalmente se observan tres tipos de flores: pistiladas, hermafroditas y estaminadas (22, 96). El fruto se desarrolla por partenocarpia (65, 81, 91).

2.3.1. Hoja

Antes de la floración el meristema apical continúa con la emisión de las hojas, las cuales aparecen en posición helicoidal. Según sea el estado de desarrollo de la planta, varía la morfología de las hojas (22). Inicialmente emergen en forma de espada, sin un limbo desarrollado. Luego aparecen hojas lanceoladas y solamente cuando se trata de la hoja adulta existe un limbo bien extendido (22, 23). Una hoja adulta posee cuatro partes: la lámina o limbo con un apéndice que es una prolongación filiforme, la cual sufre abscisión poco tiempo después de abrirse la hoja, peciolo o pseudopeciolo, vaina y nervadura central (22, 23, 97). Generalmente las hojas en su estado adulto son ovalo-oblongas, con el ápice obtuso y con un semilimbo ligeramente más grande que el otro. Esta particularidad está relacionada con la forma en que está arrollada la hoja antes de abrirse. La mitad derecha de la hoja, vista, por su lado adaxial, se arrolla sobre si misma y se acomoda en la concavidad producida por el nervio central. La parte izquierda se arrolla sobre la derecha y sobre el nervio, formando en conjunto un cilindro compacto (97). La mitad

izquierda se extiende más abajo en el peciolo y su área es un poco mayor que el semilimbo derecho (65). A los lados del meristema apical se inicia la formación de los primordios foliares (9). El intervalo entre la formación de dos primordios recibe el nombre de plastocrono y la emisión final de las láminas foliares se denomina filocrono. Generalmente, el número de hojas totales producidas por un cultivar antes de iniciarse la fase reproductiva es de un número determinado; esto sugiere una sincronización fisiológica entre el plastocrono y el filocrono (47). Simmonds (90) indicó que el patrón filotáctico varía, dependiendo de la edad y del cultivar, desde $1/3$, $3/7$ hasta $4/9$ en plantas maduras, para dar una divergencia angular entre las hojas sucesivas de 120 a 160° . Para Skutch (92) el ángulo de divergencia para hojas adultas es de 146° y en opinión de De Langhe (32) es de 150° a 170° .

Las vainas foliares son alargadas, sin ligulas, con bordes rectilíneos, excepto en sus partes terminales (22). Las márgenes opuestas de cada vaina no se yuxtaponen. Las más viejas (externas) son rechazadas hacia afuera debido al aumento de volumen ejercido por las más jóvenes en el centro del pseudotallo (22, 90). La función del pseudotallo es de sostén y de almacenamiento de reservas hidricas y amiláceas; varía en grosor y tamaño dependiendo del genótipo (90). Champion (20, 22) manifestó que en un corte transversal de la vaina es posible observar que sus bordes son muy finos,

con una parte central más gruesa. Presenta una epidermis delgada y glabra en ambas superficies. Las paredes de la epidermis externa poco a poco engrosan con deposiciones de celulosa y cutina. La vaina posee una estructura lagunar muy visible, con grandes espacios aéreos (alvéolos), que llegan hasta la vena media. Estos alveolos generalmente están llenos de aire, sin embargo, pueden contener también agua o mucílago (3). Las separaciones entre los espacios aeríferos son longitudinalmente continuas y poseen hacecillos conductores liberoleñosos y haces de fibras. Las separaciones o septos transversales son más irregulares, con haces que presentan anastomosis entre los haces longitudinales (22). Simmonds (90) señaló que los espacios aeríferos están separados radialmente por septos parenquimáticos y horizontalmente son frecuentemente interrumpidos (cada 2 a 6 mm) por septos delgados. Los septos están formados de parénquima y aerénquima. Tomlinson (101, 102) explicó que los haces vasculares pueden ser diferentes en tamaño y que existen laticíferos articulados en asocio con ellos. Además, este autor mencionó que la hipodermis abaxial de las vainas foliares externas presenta con frecuencia esclerosis. La hipodermis es primeramente suberizada y posteriormente lignificada. En opinión de Simmonds (90) los hacecillos vasculares están caracterizados por un alto desarrollo del floema y están asociados con vasos de latex esquizógenos. Los haces más externos en la vaina están rodeados de esclerénquima con una

función obviamente mecánica. Skutch (95) escribió que el floema tiene elementos cribosos de un diámetro de 65 micras por 2,5 mm de largo y que los elementos traqueales del xilema miden hasta 250 micras de diámetro y 5 a 6 cm de largo. Hacia su parte distal la vaina foliar es gradualmente contraída y se traslapa con el peciolo (90).

En su parte adaxial el peciolo es acanalado y en su lado abaxial es convexo (96). Una porción considerable del volumen del peciolo es ocupado por espacios aeríferos (alvéolos), que están dispuestos en cadena longitudinal, interrumpidos por tabiques transversales, igual que en la vaina. Sin embargo, los espacios son más angostos. Las paredes de la epidermis están engrosadas con celulosa y la hipodermis es lignificada. Los haces de fibras están más juntos y consecuentemente le confieren la rigidez necesaria para sostener el peso del limbo (90).

La lámina foliar es dorsiventral, glabra y anfistomática (43). Está dividida en dos semilimbos por la nerviación central, que es una continuación del peciolo, el cual se adelgaza progresivamente hasta el ápice de la hoja (22). El limbo evidencia una coloración verde intensa en su superficie adaxial y más o menos glauca en la abaxial. La lámina es delgada y su espesor varía de 0,35 mm a 1 mm, dependiendo de la variedad y de la ploidia. Es más gruesa cerca de la vena central y disminuye hacia el borde. Simmonds (90) mencionó que el espesor del limbo tiene la

siguiente relación: 490, 600 y 630 micras según aumenta el grado de ploidia, desde diploide, triploide, hasta tetraploide, respectivamente. Sus dimensiones (largo, ancho) también presentan variación, especialmente debido a características de fenotipo (porte bajo o alto), con una anchura de 70 a 100 cm y en longitud de 200 a 400 cm (90). Generalmente la parte distal está semitruncada y la basal presenta una disminución progresiva, que hace a uno de los semilimbos más redondeado que el otro. La lámina foliar está atravesada por nerviaciones secundarias paralelas, ligeramente más visibles en el lado adaxial, con un distanciamiento entre sí de 5 a 10 mm (90). Estas nerviaciones se prolongan desde el nervio central hasta el margen foliar, casi perpendicular al eje, con excepción de las extremidades de la hoja, donde progresivamente se hacen oblicuas. Existen otras venas menores (90). La forma de la hoja es ovalada (3, 22). Champión (22) mencionó que al realizar un corte transversal de la hoja es posible corroborar que a cada nerviación le corresponde un haz liberoleñoso. Los hacecillos conductores de las venas se adelgazan conforme se acercan al margen y confluyen en un haz marginal delgado y débil. Por tal razón, es tan fácil producir rajaduras del limbo entre las venas secundarias, desde el margen hasta el nervio central (22).

Skutch (92) indicó que entre el nervio central y el inicio del limbo se localiza un tejido que él denominó

"banda pulvinular", formado por células sensibles a las variaciones de turgencia. Esta condición le permite a los semilimbos efectuar un movimiento tipo "bisagra". En casos de déficit hídrico, los semilimbos se pliegan hacia abajo a lo largo del nervio central (22). En esta zona se observan numerosos haces vasculares con vainas esclerotizadas gruesas, y no hay espacios aeríferos.

La hipodermis, está constituida por células alargadas, incoloras. Es ancha cerca de la vena media y muy delgada cerca del margen del limbo; presenta dos capas de células en la parte adaxial y una capa en la superficie abaxial (83). El parénquima en empalizada en la parte adaxial es de 2 a 4 capas. En el lado abaxial el mesofilo está sustituido por espacios aeríferos, atravesados en algunos casos por células de clorénquima (83). Los espacios aeríferos son segmentados por tabiques transversales que se extienden desde el parénquima en empalizada adaxial hasta la hipodermis abaxial (83). /

Estos tabiques o septos presentan células tubulares de paredes delgadas. Pocas veces están atravesados por pequeños haces vasculares comisulares. En Musa acuminata se han observado (3) septos con algunas células de paredes engrosadas. En algunas venas mayores de la lámina se encuentran tubos laticíferos largos, articulados, que contienen mucilago (3).

La cutícula es irregular. La epidermis posee células con las paredes externas más gruesas que las paredes internas (3). La epidermis abaxial es menos uniforme que la adaxial y tiende a formar zonas costales e intercostales en aquellos cultivares, en los cuales los estomas se encuentran organizados en hileras (3). Las paredes anticlinales de la epidermis no son sinuosas, con excepción de Musa beccarii, Musa laterita, Musa flaviflora y subespecies de Musa acuminata (3). Sin embargo, pueden presentar células anchas y cortas sobre las paredes anticlinales de la hipodermis. Las células restantes son rectangulares. En Musa acuminata y cultivares muy ligados a esta especie, se encuentran células epidérmicas longitudinales, con tendencia a ser isodiamétricas (3, 96).

Los estomas se encuentran en ambas superficies de la hoja. Skutch (92, 93) señaló que están alineados regularmente entre la nervación secundaria paralela. Este autor calculó que la densidad es mayor en el envés ($220/\text{mm}^2$) que en la haz ($54/\text{mm}^2$) para el cv. Gros Michel.

Resultados de varios autores (12, 43, 63, 89) indican que los estomas son más frecuentes en la superficie abaxial que en la adaxial. Cada cultivar posee una densidad estomática diferente. Soto (96) manifestó que una hoja de banano 'Valery' o 'Gran Enano' puede tener de 150 a 300 millones de estomas. Simmonds (89) argumentó que los estomas de plantas maduras no están distribuidos al azar a

través de toda la hoja y que existe una relación de 3 a 5 entre haz y envés. También este autor señaló que son más numerosos cerca del ápice de la hoja y que el tamaño es proporcional al grado de ploidia. Borges (12) también relacionó el tamaño de los estomas con la ploidia. Experimentalmente trabajó con diploides, triploides y tetraploides, muestreando secciones de hojas por el envés a un tercio del ápice. Este autor encontró que a mayor ploidia mayor el tamaño de estomas, oscilando desde 25,2 micras en los diploides hasta 35,1 micras en los tetraploides. La densidad por mm^2 disminuyó según aumentó el grado de ploidia, desde 67,1 en los diploides hasta 47,7 en los tetraploides, o sea en forma de una relación inversa.

Lorenzo, Prendes, Rodríguez y Blesa (67) estudiaron en 'Cavendish' la distribución estomática y encontraron que la densidad fue superior en la superficie abaxial, con respecto a la adaxial, en una relación de 3 a 1. Concluyeron, además, que en el lado adaxial, para todos los casos analizados (muestreos), la mayor densidad se localizó en la zona próxima a la vena central, alcanzando valores menores cerca del margen. Asimismo determinaron densidades mayores en las zonas subapical y apical, con valores mínimos en la parte basal de la hoja. Con respecto a la superficie abaxial las mayores densidades fueron encontradas en la zona central. Las zonas próximas a la vena central mostraron valores intermedios y hacia el margen fueron mínimos.

También observaron densidades altas en las zonas subapical y apical.

Flores, Soto y Bolaños (43) estudiaron hojas de los triploides 'Gros Michel', 'Dwarf Cavendish', 'Giant Cavendish', 'Valery' y 'Lacatán'. Analizaron la densidad y el tamaño de los estomas. Para tal efecto, muestrearon la cuarta hoja a $1/3$ de la longitud de la lámina, a partir de la base. El número de estomas por mm^2 fue distinto para cada cultivar, con menor densidad en la parte adaxial y la mayor en la abaxial, con excepción del cv. Giant Cavendish, donde se observó un elevado número en la superficie adaxial. La longitud del ostiolo varió para cada cultivar. Los estomas de la superficie adaxial presentaron un ostiolo mayor que los observados en la superficie abaxial. Así, por ejemplo, durante la estación seca el número de estomas por mm^2 en el lado abaxial varió desde 103 en 'Giant Cavendish' hasta 152 en el 'Dwarf Cavendish', y en la parte adaxial desde 9 en 'Gros Michel' hasta 64 en el 'Giant Cavendish'. Adicionalmente estos autores concluyeron que el depósito de cera epicuticular es mayor en el envés de la lámina foliar.

2.3.2. Cormo y brotación lateral

De acuerdo con la definición (44) un cormo es un eje constituido por la raíz y el vástago que se diferencia en tallo y hojas. En el caso de M. acuminata, M. balbisiana y todos los representantes de ambas especies, se usa este

término para referirse al eje bulboso que es erecto, corto, grueso, con entrenudos vestigiales y, que según Simmonds (90) es de crecimiento monopódico. En su parte superior se desarrolla el follaje y en el extremo proximal las raíces adventicias (90). El cormo, en su mayor parte, consiste de parénquima, usualmente con abundantes gránulos de almidón (91). Subra y Guillemot (98) realizaron un estudio del cormo y concluyeron que dos zonas son evidentes: la externa o cortical, cuya función es de protección y un cilindro central, del cual se originan las raíces. Simmonds (90) indicó que el límite entre la región de la corteza y el cilindro central está claramente definido, debido a una alta cantidad de haces vasculares orientados longitudinalmente. Soto (96) explicó que la zona cortical está constituida, en gran parte, por parénquima, donde se pueden observar las trazas vasculares que suplen las hojas, las raíces y los retoños. Además, en esta zona se localizan numerosos haces vasculares que por anastomosis originan las trazas foliares que atraviesan la corteza y penetran en las bases foliares. El sistema de haces se torna más complicado, debido a la profusión de ellos, que se desarrollan para formar las raíces laterales. Asimismo la interpretación es más difícil si se piensa en el desarrollo de los haces vasculares que suplen a los retoños. En la periferia del cilindro central se observa la mayor cantidad de haces vasculares. Esta concentración de haces hace que la zona adquiera una coloración amarillenta (65). Los haces vasculares recorren

el cormo en forma irregular. Frecuentemente un haz que se inicia en una raíz atraviesa el cilindro central y regresa hasta hacer conexión con los haces de una hoja del mismo lado donde partió. A veces un haz puede atravesar el cilindro central y conectarse a los de una hoja, del lado opuesto (65). Los haces en la parte externa del cilindro central son algo horizontales. En contraste, más hacia el centro, toman una dirección longitudinal (65).

El meristema apical se localiza en una depresión, encerrada entre las bases foliares circundantes del cormo (96). Debajo del punto central de crecimiento existe lo que Skutch (94, 95) describió como un 'cambium', aunque este difiere en muchos aspectos de lo que es el 'cambium' en plantas dicotiledóneas (44).

Skutch (92, 95) distinguió cuatro tipos de haces vasculares en el cormo: a) haces principales de la traza de la hoja; se inician en la base de la hoja y siguen un curso tortuoso a través del cilindro central, hasta que finalmente se transforman en haces longitudinales secundarios, de orientación regular, en la periferia de la corteza. La relación de conducción entre el punto de origen del haz vascular en la hoja y la posición de la raíz con la cual es finalmente conectado, es de difícil interpretación; b) haces vasculares secundarios horizontales que se inician en la base de las raíces en la corteza interior y por anastomosis se juntan con los haces longitudinales en la periferia del

cilindro central. Este sistema de haces es el responsable del movimiento de savia y nutrimentos en el cormo; c) haces vasculares centrales, localizados en el centro del cilindro central en forma longitudinal y d) haces corticales en la traza de la hoja, que prosiguen un curso longitudinal e irregular en la corteza del cormo. Estos haces vasculares anastomosan con los haces vasculares principales de la traza de la hoja, donde estos cruzan la corteza; no tienen una conexión directa con las raíces.

Se presentan varios cambios en las capas exteriores del cormo, conforme éste avanza en edad (90). La epidermis se torna altamente cutinizada. Luego, debido a tensiones internas causadas por el crecimiento del cormo, suceden a veces rajaduras longitudinales en la parte más externa. En las capas situadas debajo de éstas lesiones se forma corcho. Las traqueidas de los haces vasculares de las trazas de las hojas son bloqueadas por tílides. Todos estos cambios tienen una función protectora para reducir el riesgo de invasión y daños en la superficie por microorganismos (90).

Al acercarse la etapa de floración, la parte central del cormo inicia su esclerotización (endurecimiento) de la base hacia el ápice (sentido acrópeto) (22). En las áreas esclerotizadas se limita entonces la emisión de nuevos retoños y raíces (22). Sin embargo, son evidentes los hijuelos laterales en la parte media o superior, presentando raíces funcionales. Los hijuelos están en capacidad de

favorecer nutricionalmente a la planta madre y mantenerse en comunicación con ella. Los brotes o hijuelos laterales se desarrollan de yemas laterales (22, 103).

Los entrenudos son muy cortos y consecuentemente el cormo crece poco en altura (91). Un cormo de buen desarrollo puede presentar un diámetro de 25 a 40 cm y un peso de 6,9 a 11,5 kg, dependiendo del cultivar y edad de la planta (91).

Los brotes vegetativos de muchas monocotiledóneas son laterales y ocurren en la axila de una estructura foliar. Sin embargo, en algunas monocotiledóneas, incluyendo Musa, esto no se cumple (42). Skutch (92) fue el primero quien mencionó esta inusual posición de las yemas laterales en el banano (cv. Gros Michel) y sugirió que esta posición indicaba un posible crecimiento del cormo de tipo simpodial. Posteriormente, Baker y Steward (7, 8) notaron que los hijuelos del mismo cultivar (Gros Michel) tenían su origen a cierta distancia del ápice. Estos autores interpretaron este origen como adventicio y manifestaron que el sistema de ramificación del tallo (cormo) era monopódico. Ambos autores mencionaron que los brotes adventicios se localizan en la parte opuesta a la axila de la hoja, separados del meristema apical por unas 10 hojas interpuestas. Las musáceas comestibles presentan un eje y los brotes laterales se originan a cierta distancia del meristema apical (42).

Las yemas axilares entonces no parecen localizarse en la posición clásica de las yemas laterales de otras plantas, sino a 180° de la posición original (42). En un estudio detallado Fisher (42) analizó la brotación lateral de varios cultivares y especies de Musa y concluyó que la posición a 180° es una característica genérica.

Generalmente 2 ó 3 yemas laterales de la parte media o superior del cormo son las que desarrollan nuevos brotes; consecuentemente los brotes tienden a salir cada vez más cerca de la superficie del suelo (90).

Recientemente Devos (30, 31) describió dos nuevos tipos de brotes adventicios detectados en varios cultivares de Musa (AAB). Además de los brotes laterales corrientes localizó lo que él llamó brotes tipo II y tipo III. Los brotes tipo II se encuentran dispersos alrededor de la axila y los del tipo III están situados opuestos a la axila. La presencia de ambos tipos sugiere según él una diferencia grande en cuanto a las concentraciones de reguladores de crecimiento en el grupo (AAB), al compararlo con otros triploides. Devos (31) manifestó también que es muy posible que el potencial de formación de brotes en zonas axilares sea genotípicamente presente en todos los bananos, pero que es solamente expresado en algunos cultivares de plátano.

Existe respuesta diferencial en el número de brotes producidos por planta según el cultivar. Subra y Guillemot

(98) encontraron para el cv. Robusta un promedio de 4,05 brotes. En contraste, para el cv. Gran Enano el valor promedio fue de 3,40. Las yemas del cormo al brotar crecen inicialmente en forma horizontal, casi perpendicular a la superficie del cormo; luego tienden a erguirse debido a que el meristema sufre un estímulo geotrópico negativo (96). Cuando el diámetro de la yema alcanza 6 u 8 cm, la parte basal tiende a redondearse y es evidente una constricción entre el bulbo principal y el renuevo (22). Si se realiza un corte transversal en este momento se observa la estructura del nuevo tallo, con su cilindro central y su zona cortical. Si se efectúa un corte longitudinal, se observa que el cilindro central del retoño se une directamente al cilindro central del cormo principal. La zona cortical se adelgaza progresivamente en su extremo superior hasta el punto vegetativo central (22). De acuerdo con Soto (96), a los 3 meses de edad un hijuelo puede alcanzar una altura aproximada de 50 cm, presentando sus primeras hojas de espada. Después se desarrollan hojas nuevas que poco a poco aumentan de tamaño. El sistema radical, en proceso de formación, puede estar constituido por un número grande de raíces.

2.3.3. Sistema radical

Se han realizado varios estudios morfológicos del sistema radical de Musa (21, 24, 73, 80, 82), pero pocas investigaciones anatómicas se han llevado a cabo (1, 74, 83).

Los primeros trabajos anatómicos fueron realizados por Hartman (56) en 1928 y por Acquarone (1) en 1930.

Las raíces tienen aspecto de un cordón largo, de color blancuzco cuando son jóvenes, de coloración amarillenta y ligeramente más oscuras conforme se hacen más viejas (22). Su diámetro dependiendo del cultivar puede oscilar entre los 5 a 8 mm y a veces hasta 10 mm (22). Su longitud varía, entre los 3 y 5 metros. Se presentan en grupos de tres o cuatro, originándose a partir del cilindro central. Las raíces primarias emiten secundarias con un diámetro de 2 mm aproximadamente (22). En los extremos de las raíces secundarias hay considerable cantidad de pelos absorbentes (65).

Las raíces laterales aparecen 15 a 30 cm detrás del ápice de la raíz, en la cual se originan (21). Su diámetro oscila entre 0,5 a 3,5 mm y su longitud de 3 a 15 cm. A partir de estas raíces se originan otras, menores, de 1 a 4 cm de longitud, las cuales pueden dar origen a raíces laterales aun menores (21, 22).

Monnet y Charpentier (72) afirmaron que existe correlación entre el diámetro de las raíces primarias y el nivel de ploidia. Así los valores para cultivares diploides son de 5,1 a 5,7 mm, para triploides 6,2 a 8,5 mm y para tetraploides 7,4 a 10,7 mm. A su vez el número de raíces emitidas durante el ciclo vegetativo de una planta varía con

relación al cultivar. En 'Gros Michel' por ejemplo se han contado hasta 700, en 'Poyo' 300 a 700. El grosor tiende a disminuir a partir de su punto de origen en el cormo (72).

Según Champión (22) hay casos en que hijuelos sin hojas funcionales han emitido hasta 300 raíces. Champión y Olivier (21) sugirieron que existe interdependencia fisiológica y morfológica entre el hijuelo y la planta madre, debido a que el desarrollo de raíces adventicias se correlaciona con el nivel de auxinas y estos reguladores de crecimiento se sintetizan en las hojas jóvenes. Sin embargo, Soto (96) señaló que retoños con follaje poco desarrollado llegaron a emitir hasta 225 raíces antes de producir la primera hoja funcional. Este autor sugirió también que la emisión de raíces en los hijuelos es independiente de la formación de sus hojas y que parece estar más correlacionado con las necesidades nutricionales de la planta madre.

Antes de la floración la planta puede desarrollar más de 400 raíces, de las cuales son funcionales apenas cerca del 17 por ciento del total producido (22). La formación de raíces disminuye después de la floración (22). Una planta del cv. Valery con nueve meses de edad puede tener una cantidad máxima de 500 raíces.

En cuanto a la profundidad de las raíces, Soto (96) realizó estudios con el cv. Gran Enano y concluyó que del 60

al 70 por ciento se encuentran en los primeros 30 cm de profundidad. Asimismo, a una profundidad de 60 a 90 cm sólo encontró un 10 a 15 por ciento del total.

En el caso de la germinación de una plántula de Musa balbisiana, la raíz primaria es pronto reemplazada por un sistema de raíces adventicias (69). Por el contrario en plantas de Musa establecidas asexualmente todo el sistema radical es adventicio desde el inicio (22). El origen de las raíces adventicias es endógeno, comenzando cerca de los tejidos vasculares, atravesando todos los tejidos situados fuera de su punto de origen (21, 22, 24).

Riopel (82) efectuó estudios con el cv. Gros Michel y encontró que los primordios de las raíces laterales no se originan cerca del ápice radical, sino a lo largo del periciclo sin un patrón definido. La presencia de una raíz lateral inhibe el desarrollo de otra adyacente, tanto en sentido transversal como longitudinal (82). La distribución y distanciamiento de los primordios de las raíces laterales en Musa acuminata fue estudiado por Charlton (24), quien encontró un patrón de espaciamiento regular a lo largo del protoxilema. La eliminación del ápice de la raíz primaria permite la formación posterior de 2 a 3 raíces secundarias (22).

Existen, solamente dos trabajos sobre la anatomía de las raíces. El pionero de Acquarone (1), y el de Riopel y

Steeves (83), realizado 34 años después, donde se explica y describe con más detalle la organización interna de las raíces.

El ápice radical es frágil y está protegido por una cofia de apariencia gelatinosa (22). Según la interpretación de Riopel y Steeves (83) en el ápice de la raíz los tejidos de la estela, corteza y cofia surgen de un grupo contiguo de células iniciales que se dividen menos frecuentemente que las células marginales del promeristema. Las células distales a la región estelar se dividen transversalmente, formando derivados asociados a la cofia o a la estela. El ápice consta de tres zonas (83): cofia, cilindro central y corteza. La cofia es usualmente de 900 a 1000 micrómetros de largo y sus células están organizadas dentro de una columnela central. Las células son muy vacuoladas y muchas, especialmente las de la columnela, presentan gránulos de almidón. La organización meristemática de las raíces laterales no difiere de la de las principales; presentan una cofia más pequeña y contienen pocos gránulos de almidón (83).

Las raíces son poliarcas con un número de filas radiales de xilema y floema variando desde 28 a 34 (83).

El tejido dermal no es extensivo (83). Los pelos radicales son grandes y aparecen 4 a 6 mm detrás del ápice.

Las células fundamentales de la corteza llegan a ser ligeramente suberizadas (83).

La corteza presenta espacios de aire lisígenos, que se observan en la región madura, con diferentes tamaños (83). Las células del parénquima vasicéntrico a menudo presentan tílides (83). También se observan vasos muy anchos y grupos de células de floema distribuidos en el tejido central (médula). Las raíces tienen un periciclo uniseriado y una endodermis con prominentes engrosamientos secundarios en las paredes tangenciales y radiales. Estos engrosamientos contiene suberina y lignina (83). La formación del tejido vascular es acrópeto (83).

La diferenciación de la endodermis ocurre por divisiones periclinales asociadas con el desarrollo de la corteza interior. Estas divisiones son completadas entre los 2,5 a 3 mm desde el ápice. Luego, las células de la endodermis llegan a ser vacuoladas y a la altura de 3,5 mm ellas se caracterizan por un incremento en sus dimensiones en sentido radial y longitudinal.

Los vasos del metaxilema son escalariformes y miden desde 50 a 300 micrómetros de diámetro (83). El desarrollo final de los elementos del xilema ocurre centripetamente en gran parte de la raíz.

En términos generales la anatomía de raíces de Musa cv. Gros Michel es muy similar en muchos aspectos a la que se conoce para otras monocotiledóneas (101, 102).

Estudios de la ultraestructura sobre las raíces de Musa son muy escasos (74).

2.3.4. Meristema apical

Para entender el desarrollo y el crecimiento de las plantas de banano y plátano es necesario realizar una interpretación de las regiones de crecimiento activo, particularmente el ápice en sus fases vegetativa y floral (7). La forma del meristema apical no difiere grandemente del de muchas otras monocotiledóneas (54) pero sí con algunas plantas dicotiledóneas (7).

El meristema apical está situado en el centro del cormo, creciendo en forma ascendente a través del pseudotallo (25). Barker y Steward (7) indicaron que la mayoría de las plantas de Musa son altas, pero que el punto de crecimiento es relativamente pequeño.

Fahn, Stoler y First (40) describieron cinco zonas citohistológicas diferentes en el meristema apical del cv. Dwarf Cavendish (AAA): a) la tunica, b) una zona central de células madres, c) una zona transicional, semejante a un cámbium, d) un meristema medular ("rib") y e) un meristema lateral ("flank"). El diámetro del meristema puede variar

de 180 a 270 micrómetros durante su estadio de plastócrono. La túnica generalmente consta de dos capas de células, siendo éstas más pequeñas en la capa superior que en la inferior. En la capa más al exterior de la túnica todas las divisiones son anticlinales. En la capa más interna las divisiones son anticlinales y periclinales cerca de los primordios foliares (40).

La zona central de células madres está situada inmediatamente debajo de la túnica; tiene la forma de un cono invertido y una altura promedio de aproximadamente 80 micrómetros (40). En esta zona las células tienen un diámetro de 18 micrómetros, son algo isodiamétricas, altamente vacuoladas y con paredes relativamente gruesas, con núcleos de 7 micrómetros de diámetro y un protoplasto débilmente coloreado. Las divisiones ocurren en varios planos (40).

En la zona de transición (semejante a cámbium) entre la zona de células madre centrales y los meristemas medular y lateral la actividad mitótica es relativamente alta y los planos de división son generalmente paralelos al borde más bajo de la zona central de células madre (40). Existe una correlación entre la ubicación de la zona transitoria y el desarrollo de los primordios foliares. Estos se desarrollan debajo del nivel de la zona transitoria. Este desarrollo se

inicia con divisiones periclinales en la capa más interior de la túnica (40).

El meristema medular se sitúa debajo de la zona transicional en la parte central del meristema. Posee células grandes, con menor actividad mitótica que las de la zona de transición (40). Las divisiones son principalmente transversales y como consecuencia las células en la parte central de la zona aparecen en hileras longitudinales. Hacia la periferia de esta zona el arreglo celular varía debido a la ocurrencia de divisiones diagonales. El ancho del meristema se incrementa conforme el primordio foliar se desarrolla (40).

Las células del meristema lateral son pequeñas y envuelven al meristema medular. El contenido protoplasmático de estas células es denso y la actividad mitótica es alta, especialmente en los sitios donde se inicia el primordio foliar (40).

/
Banerjee, Vuylsteke y De Langhe (5) efectuaron un estudio histomorfológico de ápices en ocho representantes de Musa cultivados in vitro. Estos autores mencionaron que luego de cuatro semanas de cultivo en un medio de multiplicación fue evidente la formación sobre los ápices de una serie de hojas cónicas, estrechamente traslapadas. Al remover estas hojas estos autores observaron varios meristemas muy pequeños en un arreglo semicircular alrededor

de un primordio foliar interno. A su vez informaron también que las células superficiales de cada domo meristemático se dividieron muy rápidamente en dirección anticlinal, resultando en la formación de un domo ancho, plano y apical. Las células en esta región fueron pequeñas, con citoplasma denso, núcleos grandes y nucléolos conspicuos. Posteriormente el domo adquiere una apariencia ondulada y finalmente son reconocidos los primordios foliares sobre los flancos de cada neoformación (brotes).

2.3.5. Flores e inflorescencia

La transición del estado vegetativo al reproductivo es muy obvio en los representantes del género Musa, ya que sucede una elongación gradual hacia arriba del ápice localizado en el centro del cormo (8). Durante esta transición se han observado varios cambios citohistológicos (40): a) incremento de divisiones celulares en la parte superior del meristema medular y en la zona central de células madre, b) presencia de ocho capas de células pequeñas incluyendo la túnica, que se tiñen fuertemente. En opinión de Simmonds (90) la inflorescencia emerge por el centro del pseudotallo, presentando un color blancuzco y un diámetro de 5 a 8 cm. Luego cambia de coloración, tornándose verde y se transforma en el pinzote o raquis externo, el cual se dobla en dirección al suelo. Cuando la actividad vegetativa cesa, el meristema central entra en

gran actividad mitótica y la túnica se espesa en dos o tres capas (8). El producto de esa actividad es muy diferente al de los meristemas laterales vegetativos y su resultado es un tallo definido, con entrenudos elongados, brácteas no circundantes en lugar de vainas circundantes y un sistema regular de formaciones axiales laterales, las flores (8).

Una vez formado el tallo floral, es posible diferenciar tres zonas: a) un escapo floral en el centro del pseudotallo que se prolonga hasta la primera bráctea vacía, b) una parte delimitada por la primera bráctea vacía y la primera con primordios florales pistilados en la axila y c) una parte comprendida entre la primera bráctea con primordios florales pistilados y el ápice de la chira (8, 65). En la inflorescencia es posible distinguir tres tipos de flores (65) pistiladas, hermafroditas y estaminadas. Los primordios florales se agrupan en cojines o manos. Cada mano posee dos filas de flores o dedos y está subtendida por una bráctea. Fahn, Stoler y First (40) mencionaron que estudios del desarrollo vascular comprueban que cada mano representa un sistema de ejes laterales que se ha hecho concrecente.

Las manos comprenden a las flores femeninas y masculinas atrofiadas. La aparición de las manos es acorde a su diferenciación, o sea de la más vieja a la más joven. Todo el conjunto de manos conforman lo que se conoce en Musa

como racimo (65). El número de manos varía, dependiendo del cultivar. El número de frutos (dedos) en una mano varía según la cantidad de flores femeninas presentes en el racimo y puede oscilar de 18 a 30 por mano (65, 105). Las brácteas (hojas transformadas) y grupos de flores se sostienen por una excrecencia del eje floral o raquis (22). Las flores femeninas carecen de capa de abscisión; en contraste, las flores masculinas la poseen (22, 65).

En las flores pistiladas hay estambres reducidos con anteras abortivas. El estilo está bien desarrollado; el estigma es globoso, penta o decalobado (65). Las flores hermafroditas poseen un ovario corto y estambres no funcionales. Las estaminadas tienen 5 estambres (más un estaminodio) y un estilo no funcional. Las flores presentan un perianto de dos ciclos de tépalos: uno mayor, externo, con cinco piezas alternas y fusionadas (3 grandes y 2 pequeñas) y otro menor, opuesto, interno (65). El ovario es infero, trilocular, con dos hileras de rudimentos seminales en los triploides AAA. Se encuentran nectarios internamente al perianto (65, 96).

Los órganos florales se desarrollan en la siguiente secuencia (65, 96): perianto, estambres y carpelos. No hay diferencia obvia en el origen de las flores estaminadas funcionales y las flores pistiladas (81). Las flores son zigomórficas (96).

Según Champion (22) el eje se curva ligeramente por geotropismo positivo. En efecto, el raquis posee pocos haces fibrosos y mayor cantidad de haces conductores inmersos en un perénquima basal.

Las flores femeninas, descubiertas, tienen el ápice dirigido hacia abajo. Las partes florales se desecan pronto y caen, pero el estigma seco puede persistir hasta la cosecha. El desarrollo del ovario se efectúa sin intervención del polen, el cual no está presente en la mayoría de los cultivares comerciales (22, 90).

2.3.6. Fruto

El fruto es una baya y se desarrolla por partenocarpia (22). Las paredes de los ovarios rellenan los tres lóculos. Luego se produce el aborto de los rudimentos seminales y el pericarpo sufre un engrosamiento (65). Los tubos laticíferos disminuyen poco a poco su actividad, cesando ésta cuando el fruto está completamente maduro (65). La forma del fruto varía, dependiendo del genótipo (97). El pericarpo (cáscara) está constituido de epicarpo (epidermis), mesocarpo (con una zona externa coloreada, con presencia de fibras, y haces vasculares y abundante almidón y taninos) y el endocarpo que presenta células de paredes muy delgadas, radiales, que permiten separar la cáscara de la parte central del fruto (65, 96). La parte comestible (masa de parénquima conteniendo azúcar y almidón)

corresponde al engrosamiento de la pared del ovario (65, 90).

El pericarpo posee un grosor de 2 a 3 mm (22). Su capa epidérmica presenta una cutícula fina y hay estomas en menor cantidad que en los limbos foliares (61, 77). En el centro de la pulpa se distinguen los tres límites de los carpelos y las líneas dobles de óvulos abortados (22).

2.4. Técnicas de propagación in vivo

Debido a que los tipos comestibles no producen semillas su propagación es asexual. Los hijuelos del cormo madre son separados para utilizarlos como propágulos. Sin embargo, mediante métodos de propagación convencional la tasa de multiplicación es muy baja. Se han realizado varios intentos para aumentar esta tasa por medio de prácticas in vivo. Por ejemplo, Barker (6) removi6 las vainas foliares de la base del pseudotallo hasta dejar al descubierto las yemas laterales, que luego se cubrieron con suelo. Este autor encontró que estas yemas rápidamente formaban rebrotes y obtuvo un promedio de 20 brotes a partir de una cepa en un intervalo de seis meses.

Hamilton (55) realizó la decapitación del pseudotallo por encima de su punto meristemático, estimulando así la formación de yemas laterales y logró 150 plantas a partir de un sólo cormo en un lapso de seis a siete meses.

Ascenso (2) estimuló la formación de brotes laterales en hijuelos de 30 cm de altura mediante la aplicación de fertilización nitrogenada; mencionó que el promedio de hijuelos secundarios obtenidos de cada planta madre fue de 15, después de 9 meses.

Loor (66) eliminó las vainas foliares de cormos jóvenes hasta dejar visible su punto meristemático. Luego realizó lesiones en este punto mediante una incisión en forma de cruz. Las plantas adventicias así obtenidas se transplantaron luego cuando alcanzaron una altura de 8 cm; hasta un total de 141 plantas fueron obtenidas por cormo. Una metodología similar fue utilizada por Dantas, Shepherd y Alves (28) quienes obtuvieron para 'Gran Enano' y 'Cinza' un promedio de 72,8 y 57,5 nuevos brotes por cormo, respectivamente.

Recientemente Molina (71) eliminó las yemas apicales de cormos de 'Gran Enano', realizando al mismo tiempo una lesión en forma de cruz sobre el punto meristemático de yemas neoformadas para estimular la formación de brotes laterales secundarios; el número máximo de brotes obtenidos de esta forma por cormo fue de 101 en un lapso de 14 semanas.

2.5. Técnicas de propagación in vitro

En los últimos diez años se han publicado gran cantidad de trabajos referentes a la multiplicación in vitro de

musáceas (4, 17, 58, 59, 64, 107). El método consiste en lograr el establecimiento y el desarrollo de pequeños ápices en un medio artificial aséptico. Se han investigado varios medios; predominan los de consistencia semisólida y no los líquidos (86). El de más amplia aceptación es el basal de Murashige y Skoog (75), en ocasiones modificado. Algunos investigadores incluyen antioxidantes en el medio nutritivo, tales como cisteína-HCl, ácido cítrico o ácido ascórbico. Mediante la adición de reguladores de crecimiento, especialmente del tipo citocinina, se estimula la multiplicación a través de la formación de yemas adventicias. Empleando esta metodología se pueden obtener altas tasas de multiplicación, ya que a partir de un ápice (explante inicial) es posible lograr teóricamente en el lapso de un año hasta más de un millón de plantas.

Para una respuesta adecuada los explantes inoculados necesitan de ciertos requerimientos. Los componentes básicos de un medio son: macronutrientes, micronutrientes, una fuente de carbono y energía, vitaminas, reguladores de crecimiento y, a veces, aminoácidos (nitrógeno reducido). En ocasiones se adicionan también componentes orgánicos, de naturaleza química no definida (agua de coco, caseína hidrolizada, extracto de malta) (60, 86).

Factores físicos tales como: intensidad de luz, fotoperiodo, temperatura y humedad relativa durante el

período de incubación de los cultivos también influyen. Todas estas variables deben estar adecuadamente relacionadas durante el trabajo experimental, ya que de una u otra manera, en gran parte, determinan el éxito o el fracaso (48).

En Musa la escasez de plántulas para el establecimiento de nuevas plantaciones y la utilización de propagulos infectados con virosis representan una seria desventaja productiva (64). En este sentido el cultivo de tejidos es una herramienta útil que posibilita: a) transferir al campo material sano, b) disponer de material de siembra en cualquier época del año, c) multiplicar aceleradamente genótipos deseables, d) transportar fácilmente los propágulos y uniformar las plantaciones (64).

Cronauer y Krikorian (17) indicaron que la desinfección del explante inicial de Musa es esencial y recomendaron realizarla con hipoclorito de sodio, de concentración variable, según las condiciones de limpieza del material. Después lavaron tres veces los explantes con agua estéril, y los inocularon en un medio Murashige y Skoog líquido. Transcurridos veintiun días realizaron un corte longitudinal a través del ápice y cada sección fue inoculada nuevamente en un medio Murashige y Skoog con presencia de benciladenina (5 mg/l^{-1}) para inducir brotación. Cuatro semanas después hubo formación de gran cantidad de brotes que fueron

separados e inoculados en un medio Murashige y Skoog sin reguladores de crecimiento y con 0,25% de carbón activado para estimular la formación de raíces. Luego de veintidos días las plantas fueron aptas para su trasplante a condiciones de invernadero (aclimatación).

Según los diversos autores, la metodología de cultivo in vitro de Musa varía en algunos aspectos de la descrita arriba. Así, por ejemplo, Banerjee y De Langhe (4) trabajaron con 8 cultivares diferentes y utilizaron explantes (ápices) de 2 a 3 mm de longitud, con 2 a 3 primordios foliares. El medio que usaron fue el de Murashige y Skoog, sin $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ni $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, con la adición de sacarosa 3%, 2 mg/l de glicina, 0,1 mg/l de tiamina-HCl, 0,5 mg/l de ácido nicotínico y 0,5 mg/l de piridoxina. Estos autores indicaron que el problema de oxidación pudo ser reducido con la adición al medio de 10 mg/l de ácido ascórbico y con la transferencia frecuente a medio fresco. Además, encontraron una respuesta diferencial genotípica con respecto al número de brotes obtenidos. Para lograr estimular la formación de brotes agregaron al medio la citocinina benciladenina y para obtener el enraizamiento de ellos usaron el medio basal de Murashige y Skoog, diluido a la mitad de su concentración original y añadieron 0,2 mg/l de ácido indolbutírico (AIB).

En la micropropagación de Musa, dos rutas de producción de brotes son posibles: axilar y adventicia (60).

La multiplicación mediante la estimulación de brotes "axilares" está supeditada al número de yemas preexistentes (60). La capacidad de multiplicación decrece conforme aumenta la frecuencia de subcultivo. Se espera que individuos propagados por yemas "axilares" muestren alta estabilidad genética (60). En contraste, la multiplicación via brotes adventicios implica diferenciación de novo a partir de tejidos adultos, que inician un patrón de diferenciación hacia tejido meristemático. A partir de éste se forman brotes adventicios, de los cuales se desarrollan luego plantas (60). La tasa de multiplicación, usando brotes adventicios, es alta, con el inconveniente de que existe mayor posibilidad de obtener variabilidad genética (60).

2.6. Aclimatación o endurecimiento de las plantas

Cualquiera que sea la metodología de micropropagación, el objetivo principal es obtener un gran número de plantas aptas para su transplante a suelo u otro sustrato. Esta etapa es crítica y se le conoce como la fase de aclimatación o endurecimiento. Frecuentemente una determinada especie se adapta más favorablemente que otra (38). Los factores que influyen se deben investigar para afinar el establecimiento y manejo de las plantas (49).

Las plantas producidas in vitro crecen en un ambiente aséptico y su desarrollo requiere de una fuente de energía exógena (azúcar), o sea, son plantas heterótrofas, con un aparato fotosintético no diferenciado o ineficiente. Además, se desarrollan bajo una muy alta humedad relativa y consecuentemente sus hojas carecen de una cutícula gruesa, y de una adecuada capa de cera epicuticular. Asimismo, el parénquima en empalizada es de poco desarrollo, con grandes espacios intercelulares y generalmente se observa baja densidad estomática. Estas características las hace muy susceptibles a la deshidratación. Así es necesario propiciarles condiciones fisiológicas adecuadas para que en la etapa de aclimatación no haya mucha pérdida de plántulas (35, 36, 37). Por ello se mantiene durante la fase inicial de la aclimatación, la humedad relativa casi del 100% mediante nebulización. No obstante, se debe tener cuidado para no incrementar el contenido de humedad del sustrato hasta saturación continua, impidiendo niveles convenientes de CO_2 y O_2 . En cuartos de humidificación cerrados se mantiene una humedad relativa alta sin saturar al sustrato (41). La aplicación de antitranspirantes es una alternativa (49).

Generalmente se cultivan especies tropicales a temperaturas entre los 21° y $27^{\circ}C$. Las plantas provenientes de cultivo in vitro necesitan al inicio de una intensidad lumínica baja; gradualmente la intensidad debe aumentarse.

En el invernadero, la utilización de mallas de sombreo es frecuente; de acuerdo a su densidad, proporcionan determinado porcentaje de sombra (49).

2.7. Cambios in vitro y durante la aclimatación

Varios autores (33, 34, 37, 50, 53, 88, 100) han mencionado que las condiciones in vitro pueden afectar la anatomía de las plantas micropropagadas. Se conoce relativamente poco sobre como los aspectos morfológicos y anatómicos pueden influir positiva o negativamente durante la etapa de aclimatación (108, 110). Así, por ejemplo, Grout y Aston (51, 52) realizaron investigación con Brassica oleracea var. botrytis in vitro y encontraron que, mientras las plantas permanecían en cultivo aséptico, diferencias morfológicas y fisiológicas fueron evidentes en comparación con plantas propagadas convencionalmente. Estos autores informaron que las plantas in vitro presentaron muy poca cera epicuticular en las hojas y una ineficiente conexión vascular ente la raíz y el vástago. Consecuentemente fueron muy vulnerables a marchitarse. Hojas de plantas no micropropagadas mostraron una anatomía característica de la especie. En contraste, hojas de plantas micropropagadas exhibieron algunas modificaciones en los tejidos internos. Hojas de plantas con siete semanas de permanencia en medio líquido no mostraron desarrollo de parénquima en empalizada. Hojas de plantas con igual tiempo de permanencia en cultivo, pero en medio semisólido,

presentaron una limitada diferenciación del parénquima en empalizada. Después de transcurrido el período de aclimatación plantas que provenían de cultivo in vitro mostraron hojas anatómicamente iguales a las hojas de plantas propagadas in vivo (51, 52).

Brainerd, Fuchigami, Kwiatkowski y Clark (14) señalaron que la disminución en el tamaño de células del parénquima en empalizada, la presencia de grandes espacios intercelulares y la baja densidad estomática, fueron los factores responsables de la desecación de un alto porcentaje de plantas de Prunus insititia L. cv. Pixy propagadas in vitro. Sutter y Langhans (99) opinaron que la dificultad para la obtención de un 100% de supervivencia durante la aclimatación de Dianthus caryophyllus L. es la poca formación de cera epicuticular en las hojas de las plantas.

Donnelly, Vidaver y Lee (37) estudiaron la anatomía de hojas, pecíolos, tallos y raíces de plantas de Rubus idaeus L. propagadas asépticamente. También incluyeron los aspectos anatómicos de las mismas partes en plantas con cinco semanas de aclimatación. Estos autores indicaron que los pecíolos in vitro son frágiles, de poco diámetro, con carencia de células tipo colénquima y con pocas fibras floemáticas. En contraste, pecíolos de plantas en aclimatación mostraron incremento en diámetro y aumento en el número de elementos vasculares en el floema y en el xilema. Además, el esclerénquima fue muy evidente. Las

células epidérmicas de hojas de plantas cultivadas in vitro aparecieron en algunos casos colapsadas, posiblemente debido a la alta humedad relativa persistente durante su incubación en condiciones asépticas (37). Asimismo, las hojas in vitro fueron pequeñas, más delgadas y con menos tejido clorenquimático con respecto a hojas con cinco semanas de permanencia en aclimatación. En el tallo de plantas in vitro se observó poco colénquima en la corteza, muy pocas fibras de esclerénquima y células con paredes delgadas (37). En plantas aclimatadas se encontró un aumento de colénquima en la corteza, fibras de esclerénquima en el floema y un poco de engrosamiento en las paredes de las células de la medula. Las raíces de plantas adultas de Rubus idaeus L. presentaron una peridermis múltiple; en contraste las plantas in vitro tenían muy poca peridermis. En plantas en etapa de endurecimiento fue evidente el desarrollo de una peridermis intermedia, en transición (37).

Wetzstein y Sommer (109, 110) realizaron un estudio con el objetivo de observar la anatomía interna de plantas de Liquidambar styraciflua en cultivo in vitro y en etapas posteriores durante su aclimatación.

En hojas de plantas cultivadas in vitro no había un parénquima empalizada completo, el mesofilo era muy lagunoso, con partículas de material ergástico en los vacúolos de sus células (109, 110). La epidermis adaxial poseía células de forma ovalada y la abaxial fue similar,

excepto que sus células fueron más pequeñas y de paredes delgadas. Los estomas estaban presentes sólo en la epidermis abaxial. En el citoplasma se detectaron dictiosomas, cloroplastos y mitocondrios. A veces los cloroplastos poseían gránulos de almidón y en la epidermis abaxial las células tenían un gran vacuolo central con muy poco citoplasma. La cuticula no se notó con claridad. Hojas en fase de aclimatación mostraron poca diferenciación del mesofilo esponjoso y parénquima en empalizada. El parénquima esponjoso presentó pocos y pequeños espacios aeríferos en comparación a hojas de cultivo in vitro. Las células de epidermis adaxial fueron más grandes que las de la epidermis abaxial, pero mantuvieron su configuración ovalada (109, 110).

Las células del mesofilo tenían más alto contenido citoplasmático que el mesofilo de hojas in vitro. Se observaron numerosos dictiosomas, plastidios, reticulo endoplasmático y mitocondrios. Los cloroplastos fueron muy evidentes en el parénquima esponjoso y en el empalizada. La cuticula fue muy evidente en la epidermis adaxial y abaxial (109, 110).

Wetzstein y Sommer (109, 110) encontraron en plantas establecidas en condiciones de campo que las células del parénquima en empalizada y el parénquima esponjoso estaban bien diferenciadas. El mesofilo se presentó compacto, con pocos espacios intercelulares y en sus células había

abundantes taninos y sustancias fenólicas. Los cloroplastos fueron muy evidentes y las células subepidermales pequeñas. En el citoplasma se apreciaban mitocondrios, dictiosomas y cloroplastos. Además, el retículo endoplasmático y los ribosomas eran conspicuos. La cutícula estaba bien desarrollada y gruesa. Estos autores concluyeron que las características anatómicas observadas en hojas de Liquidambar styraciflua cultivadas in vitro están correlacionadas con una tendencia o susceptibilidad a la desecación durante su aclimatación. Las plantas en aclimatación experimentaban cambios asociados con variaciones en las relaciones hídricas (109, 150), como lo son: desarrollo de espacios intercelulares, formación de una cutícula gruesa y estomas hundidos. Además, otros factores estaban involucrados durante la adaptación (cambios en la ultraestructura de los cloroplastos, contenido citoplasmático, componentes ergásticos vacuolares). La comprensión de estos factores es requisito para que, mediante un manejo adecuado del proceso de aclimatación, se minimiza los porcentajes de mortalidad ocurridos en algunas especies de plantas al pasar de un estado heterótrofo al autótrofo.

En opinión de Short, Wardle, Grount y Simpkins (88) las hojas de plantas cultivadas in vitro no son la fuente primaria de nutrimentos orgánicos, ya que hay disponibilidad de ellos en el medio de cultivo. Funcionalmente estas hojas

podrían ser consideradas anómalas, debido a que presentan una actividad fotosintética reducida, no crecen después del trasplante a suelo y rápidamente mueren (88). Por el contrario, las hojas que se forman después del trasplante crecen rápidamente, fotosintetizan y emergen constantemente nuevas hojas (88). Esto sugiere que las hojas formadas en cultivo in vitro son solamente una forma transicional hasta que las hojas verdaderas hayan emergido. Wetzstein y Sommer (109) mencionaron que las plantas in vitro, por permanecer en condiciones nutricionales heterótrofas, no requieren la realización del proceso fotosintético, pero que se han encontrado evidencias preliminares de que las plantas in vitro son capaces de fotosintetizar con una tasa muy baja. De acuerdo con Esau (39) el parénquima en empalizada comúnmente es un tipo especializado de tejido fotosintético, al estar los cloroplastos en una posición favorable con respecto a la luz. La falta de una diferenciación completa del parénquima en empalizada en hojas de plantas in vitro sugiere una capacidad fotosintética menor (109). Es evidente que varios factores influyen durante la fase de aclimatación y son necesarios estudios adicionales para entender mejor este proceso (13, 15, 38, 88).

3. MATERIALES Y METODOS

La investigación principal se llevó a cabo en el laboratorio de histología de la Unidad de Biotecnología, CATIE, Programa 1, Mejoramiento de Cultivos Tropicales, Turrialba, Costa Rica.

3.1. Material Vegetal estudiado

El material vegetal experimental consistió en plantas de Musa crecidas in vitro, otras en fases de aclimatación en invernadero y plantas desarrolladas en condiciones de campo.

3.1.1. Especies, cultivares y genoma

Se utilizaron plantas de banano de los cultivares Gran Enano (AAA), Gros Michel (AAA) y Valery (AAA). También se realizaron observaciones en los cultivares de plátano Falso Cuerno (AAB) y Pelipita (ABB), cuyos genomas están compuestos por contribuciones de M. acuminata y M. balbisiana. Además, se trabajó con material de las especies Musa acuminata (AA), M. balbisiana (BB) y M. textilis (abacá) procedentes de la colección de musáceas del CATIE.

3.1.2. Cultivo in vitro

Para obtener el material se realizaron tres pasos: a) establecimiento del cultivo, b) multiplicación de brotes y c) obtención de plantas aptas para su trasplante a suelo (aclimatación). A continuación se describe el procedimiento utilizado.

Se separaron hijuelos de cormos de los cultivares Falso cuerno (AAB), Pelipita (ABB), Valery (AAA) y Gran Enano (AAA) de plantas cultivadas en campo. Se eliminaron las partes externas del cormo y vainas foliares hasta obtener secciones de aproximadamente 5 cm de largo y diámetro, que contenían al ápice vegetativo. Este material fue sometido a una primera desinfección con hipoclorito de sodio (blanqueador comercial "Ajax cloro", 5,25% ingrediente activo) sin diluir, durante 20 minutos, seguido por dos lavados de cinco minutos cada uno con agua estéril. En condiciones asépticas se redujo el tamaño del material aún más hasta 2 cm aproximadamente; este explante consistió entonces de una parte del cormo y varios primordios foliares envoltentes del meristema (85).

Seguidamente se realizó una segunda desinfección por espacio de 10 minutos con hipoclorito de sodio ("Ajax cloro", diluido) 10% (v/v), más 2 gotas de Tween 20 por cada 100 ml de solución desinfectante. Después se practicaron dos lavados de tres minutos cada uno con agua destilada esterilizada y se procedió en condiciones estériles a reducir el tamaño de los ápices hasta 5 mm de longitud y diámetro.

Previo a su inoculación, los explantes se sumergieron durante 10 minutos en una solución acuosa estéril de cisteína-HCl (50 mg.l^{-1}).

Los explantes se cultivaron en el medio inorgánico de Murashige y Skoog (75), suplementado con: sacarosa, mio-

inositol, ácido nicotínico, piridoxina-HCl, Tiamina-HCl, glicina, 6-bencilaminopurina (BAP), y Bacto agar (Difco) (Cuadro 1). El pH del medio se ajustó a 5,7 con NaOH 0,1N antes de colocar alicuotas de 10 ml en tubos de vidrio de 11x2,5cm. La esterilización se realizó en autoclave a una presión de 1,05kg/cm² durante 15 minutos.

La etapa de iniciación duró aproximadamente 30 días. Posteriormente los explantes fueron transferidos al medio básico, pero con mayor cantidad de citocinina (Cuadro 1) donde permanecieron durante 60 días para estimular la formación y multiplicación de brotes. Luego los brotes fueron separados e inoculados en el medio básico (Cuadro 1) por espacio de 30 días sin presencia de citocinina para estimular el crecimiento y el enraizamiento.

Durante las tres fases de cultivo los explantes se incubaron a 27°C \pm 2°C, 70% humedad relativa y un fotoperíodo de 16/8 horas. Como fuente de luz sirvieron lámparas fluorescentes tipo Luz de Día, que emitían una iluminancia de 3000 lx al nivel de los cultivos. Una vez ocurrida la rizogénesis, las plantas fueron aptas para su trasplante a un sustrato no estéril. Para los estudios microscópicos de raíces, cormo y hojas las muestras de plantas fueron escogidas al azar tanto en el medio de crecimiento como de enraizamiento. Para los estudios de anatomía foliar se usaron segmentos centrales de las hojas número uno y dos.

Cuadro 1. Medios de cultivo utilizados en las etapas de la micropropagación de Musa

Etapa de iniciación

<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>			
	<u>en peso</u>		<u>molaridad</u>	
NH ₄ NO ₃	1650	mg	20,6	mmol
KNO ₃	1900	mg	18,8	mmol
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	mg	2,99	mmol
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	mg	1,50	mmol
KH ₂ PO ₄	170	mg	1,25	mmol
H ₂ BO ₃	6,2	mg	100	µmol
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	mg	100	µmol
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	mg	29,9	µmol
KI	0,83	mg	5,00	µmol
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	mg	1,03	µmol
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	mg	0,100	µmol
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	mg	0,105	µmol
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	mg	100	µmol
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37,4	mg	100	µmol
Sacarosa	30000	mg	87,6	mmol
M-inositol	100	mg	555	µmol
ácido nicotínico	0,5	mg	4,09	µmol
Piridoxina-HCl	0,5	mg	2,43	µmol
Tiamina-HCl	0,1	mg	0,296	µmol
Glicina	2	mg	26,6	µmol
BAP	1	mg	4,44	µmol
Bacto agar (Difco)	7000	mg	-	

Etapa de multiplicación:

Para lograr la multiplicación de brotes la concentración de BAP se aumentó a 4 mg/l.

Etapa de enraizamiento:

Para la etapa de crecimiento y formación de raíces se utilizó el medio de iniciación desprovisto del regulador de crecimiento.

3.1.3. Aclimatación

Después de un mes de permanencia en medio de enraizamiento los brotes desarrollados presentaron abundantes raíces y de cuatro a cinco hojas. Estas plantitas se sacaron del tubo y luego se removió el residuo de agar con agua corriente. Se sembraron en bolsas de polietileno (17,5 x 23 cm), de color negro, que contenían suelo franco limoso sin esterilizar. Inmediatamente, se colocaron en invernadero en cámaras de humidificación, cubiertas con plástico semitransparente, permitiendo un sombreado del 50% aproximadamente. Durante el día, a cada hora se efectuó un riego de 30 segundos mediante nebulización, durante un lapso de 35 días. Después, las plantas se sacaron de estas cámaras y se colocaron en mesas dentro del invernadero con una temperatura de $27 \pm 5^{\circ}\text{C}$ y mayor intensidad lumínica. El riego de las plantas con agua se realizó una vez al día. En estas condiciones las plantas permanecieron hasta 300 días. No se aplicó ningún insecticida o fungicida. Para todas las plantas se efectuó a los 60 días del trasplante una fertilización con 0,5 g por planta de un fertilizante de la fórmula 10-30-10.

En estas plantas se hicieron observaciones morfológicas en hojas, raíces y cormo. Asimismo, se efectuaron muestreos de las mismas partes para su estudio microscópico. Para el estudio de la anatomía foliar se muestrearon hojas emergidas después del trasplante. Siempre se muestreó la hoja desarrollada número dos.

3.1.4. Material de campo

Para las observaciones pertinentes en este material se estudiaron plantas ubicadas en la colección de musáceas del CATIE, en la Estación Experimental La Lola (CATIE) y en la Finca Experimental de la Asociación Bananera Nacional (ASBANA), ubicada en 28 Millas (Provincia de Limón, Zona Atlántica, Costa Rica). Las muestras para el estudio microscópico de la parte vegetativa se colectaron en plantas que todavía no presentaban floración. En el caso de la investigación anatómica en hojas, se muestreo siempre la hoja número dos completamente desarrollada en su parte subapical (25 cm antes del ápice). También se realizaron observaciones morfológicas y anatómicas sobre hojas en hijuelos de espada, cormo, raíces y vainas del pseudotallo.

3.2. Preparación del material y observaciones morfológicas y anatómicas

Las observaciones morfológicas y el estudio anatómico se realizaron en cortes frescos, semipermanentes y material procesado (permanente).

3.2.1. Cortes frescos

Sosteniendo el material fresco con un soporte y con la ayuda de una navajilla se hicieron cortes, transversales y longitudinales, buscando los materiales más idóneos posibles para aprovechar las ventajas citadas por O'Brien y McCully (76). Cada corte se puso sobre un portaobjeto, se agregaron dos a tres gotas de agua y luego se le colocó el cubreobjeto

y se observó al microscopio. La finalidad fue familiarizarse con la organización interna de los tejidos de las mismas partes de la planta que en su mayoría fueron observadas posteriormente en preparaciones permanentes.

Para observar posible cutinización se agregaron unas gotas de sudán-glicerina (1 g de sudán IV, disuelto en 100 ml de etanol 95%; después de calentar se adicionó 40 ml de glicerina a 60 ml de la solución saturada del colorante) y se calentaron las preparaciones hasta formarse burbujas debajo del cubreobjeto (84). La reacción de lignina se efectuó, adicionando unas gotas de una solución alcoholica de floroglucina al 1% y después unas gotas de ácido clorhídrico concentrado.

Para la determinación de almidón se empleó una solución de iodo en yoduro de potasio (0,5 g de yoduro de potasio, más unos cristales de iodo y luego se aforó a 1000 ml).

3.2.2. Preparaciones semipermanentes

Los cortes de material fresco que se observaron al microscopio y que presentaban características adecuadas para su estudio, fueron conservados en forma semipermanente. Para este fin se agregó al portaobjeto gelatina glicerinada, preparada según la recomendación de Berlyn y Miksche (10) y (Cuadro 2). Se calentó levemente el portaobjeto con una porción adecuada de gelatina hasta licuarla, se adicionó el material y luego se colocó el cubreobjeto.

Cuadro 2: Componentes y proporciones de la gelatina glicerizada

COMPONENTES	CANTIDAD
Gelatina	5 g
Agua a 35°C	30 ml
Glicerina	35 ml
Cristales de fenol	0,5 g

3.2.3. Preparaciones permanentes

El material se escogió según el objetivo y se recortó en secciones pequeñas. Luego, rápidamente fue colocado para su fijación en FAA (formalina, ácido acético, alcohol) modificado en sus proporciones de la siguiente manera: alcohol 70% 90 ml, ácido acético 5 ml, formalina (37%) 5ml, más 3 gotas de Tween 20 (10). Lo anterior se hizo con el objeto de obviar problemas de fijación observados en pruebas preliminares, donde fue evidente el colapso de los tejidos, especialmente en partes de la planta provenientes de cultivo in vitro. Se dejó el material en FAA por espacio de 24 horas. Después se procedió a deshidratar las partes vegetales fijadas para lograr una adecuada inclusión en la parafina. La deshidratación consistió en un tratamiento diferencial con respecto al tiempo, mediante una serie de

mezclas de alcohol butírico terciario con agua, en concentraciones progresivamente ascendentes (Cuadro 3).

Cuadro 3: Concentraciones y tiempo de permanencia en TBA de los objetos fijados durante su deshidratación

Número	%	TIEMPO
TBA 1	50	2 horas
TBA 2	70	12 horas
TBA 3	80	2 horas
TBA 4	85	1 hora
TBA 5	90	1 hora
TBA 6	95	1 hora
TBA 7	100	12 horas
TBA 8	100	4 horas

Siguiendo la metodología descrita por Sass (10), una vez concluida la deshidratación se realizó la infiltración gradual en parafina. Con esta finalidad se adicionó parafina derretida a las preparaciones deshidratadas las que fueron puestas en una estufa a 58°C. En total se hicieron tres cambios de parafina. Finalmente, se moldeó en bloques. Con la ayuda de pinzas finas y agujas de disección se colocaron y orientaron los objetos antes de la solidificación de la parafina. Luego de identificar cada bloque estos fueron puestos en agua fría para lograr un

enfriamiento rápido y evitar una posible cristalización de la parafina.

Los bloques de parafina se pegaron a soportes de madera que se ajustaron a un micrótomo rotatorio (AO Spencer). Con éste se cortó el material con un espesor de 15 a 20 micras. Según el material se realizaron cortes transversales, paradermales y longitudinales. Para adherir los cortes a los portaobjetos se colocó en estos una gota del fijador Haupt que se dispersó por la superficie, al igual que unas gotas de formalina al 3%. Seguidamente, los cortes fueron extendidos sobre el portaobjeto y después de un secado por un tiempo prudencial (1 a 2 días), las láminas estuvieron aptas para su coloración.

La coloración de las láminas se efectuó con safranina y verde rápido en una serie descendente y otra ascendente de alcohol etílico (10). La duración de los tiempos de tinción aparece en el Cuadro 4. Por último, se adicionaron unas gotas de Permunt (R) (Fisher Scientific Company) al portaobjeto y se le colocó el respectivo cubreobjeto.

Cuadro 4: Metodología de coloración safranina-verde rápido, secuencia y tiempos de tinción

PRODUCTO	TIEMPO
Xilol	5 minutos
Etanol absoluto	5 minutos
Etanol 95	2 minutos
Etanol 70	2 minutos
Etanol 50	2 minutos
Etanol 30	2 minutos
Agua	2 minutos
Safranina	30 minutos
Agua	5 minutos
Etanol 30	2 minutos
Etanol 50	2 minutos
Etanol 70	2 minutos
Etanol 95	5 minutos
Verde rápido	30 segundos
Etanol absoluto I	5 minutos
Etanol absoluto II	5 minutos
Fenol-xilol	5 minutos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	2 minutos
Xilol III	2 minutos

3.2.4. Diafanización de hojas y observación de estomas

Para estudiar la venación foliar se colocaron hojas pequeñas de plantas cultivadas in vitro y secciones de hojas maduras en una solución acuosa de NaOH 5% durante 7 a 15 días. Cada dos días se cambió la solución de NaOH; para acelerar la clarificación se dejó el material a 45°C sobre una plancha con termostato. Después de un cuidadoso lavado, el material diafanizado fue coloreado con safranina (1%) durante 5 minutos. Luego, se deshidrató en una serie ascendente alcohólica y fue sellado con resina y cubreobjeto.

Para el estudio de la epidermis y de la distribución estomática se pasó laca de uña transparente sobre las superficies correspondientes. Después de secarse, se quitaron cuidadosamente segmentos de la laca endurecida para obtener réplicas de las superficies y, poder observar la estructura y características de las células epidérmicas y estomas.

3.2.5. Microscopía óptica

Las observaciones se realizaron en un microscopio Carl Zeiss Standard, en aumentos de 32X, 80X, 190X y 320X. Asimismo, colocando una cámara lúcida (Carl Zeiss) se logró visualizar y dibujar los contornos de las estructuras. Además se efectuaron mediciones de algunas de las partes en estudio. Par tal efecto se utilizó un ocular micrométrico de tornillo (Leitz 12.5X) calibrado con un micrómetro de

objeto (Leitz). Después de seleccionar las mejores láminas correspondientes a cada órgano se procedió a realizar la descripción e interpretación de cada una de ellas.

3.2.6. Microscopía electrónica de barrido

De acuerdo con lo mencionado por otros autores en otras plantas (29, 41, 87, 106) se realizó para complementar ciertos detalles estructurales de algunos órganos.

El material escogido para microscopía electrónica de barrido fue fijado en FAA durante 48 horas a la temperatura ambiente. Luego fue deshidratado en una serie ascendente de alcohol etílico y se llevó hasta el punto de secado crítico con CO₂ en un desecador Hitachi modelo HCP-2. Los especímenes se montaron en soportes de aluminio, usando pintura conductora de plata y se cubrieron con una capa de oro durante tres minutos en un cobertor iónico Eiko modelo IB-3. Finalmente las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi HHS-2R. Las fotografías se tomaron con película Verichrome Pan Kodak VP 120.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Plantas in vitro

Se conoce muy poco en Musa como influyen las condiciones de cultivo in vitro sobre el desarrollo y estructura de las plantas obtenidas. Así, a continuación, se presentan y se discuten los resultados observados referentes a aspectos morfológicos-anatómicos de raíces, cormo y hojas.

4.1.1. Morfología y anatomía de raíces

En las plantas de Musa micropropagadas la formación del sistema radical se produjo rápidamente en el medio semisólido de Murashige y Skoog (75) sin reguladores de crecimiento. Esto sugiere que el nivel endógeno de auxina fue suficiente para estimular la rizogénesis, ya que la adición de auxinas en esta fase disminuye la formación de raíces y la presencia de citocininas la inhibe (48).

Las raíces son delgadas, flexibles, con un diámetro de 2 a 3 mm y un largo que puede llegar a medir más de 150 mm. Estas raíces presentan abundantes formaciones apendiculares (pelos radicales), que disminuyen en número o desaparecen del todo si las raíces se encuentran dentro del agar. En otras especies se ha observado algo similar e, incluso, ausencia total de pelos radicales, debido probablemente a la alta concentración de agua existente en el gelificante (48). El tamaño de los pelos absorbentes oscila entre los 4 a 6

mm, pero alcanzan a veces hasta más de 10 mm. La zona pilífera se inicia a unos 5 mm atrás del ápice de la raíz y puede extenderse hasta más de 10 cm debido a la persistencia de los pelos en las condiciones in vitro.

Las raíces se originan principalmente de la parte basal del explante, frecuentemente en la zona de las bases de las vainas envolventes del pseudotallo (Fig. 2). Las raíces casi siempre son de color blanquecino, en algunos casos de color café negruzco, especialmente en aquellas plantas con una permanencia en cultivo más allá de los 3 meses. Los ápices de las raíces son muy visibles; miden aproximadamente 2 mm y presentan una coloración cremosa. Se observa también a cierta distancia del ápice radical la formación de raíces secundarias, con un tamaño que oscila entre los 13 a 20 mm. Cuando la rizogénesis es inducida en un medio líquido las características morfológicas de las raíces son generalmente semejantes a las descritas, sin embargo, son un poco más delgadas y hay menor o ninguna formación de pelos radicales. En algunos casos, si la agitación de un medio líquido no es la adecuada, posiblemente sucedan problemas por aeración. Además, los brotes y raíces crecen más ordenadamente en un medio gelificado (48).

Cortes transversales de raíces de plantas in vitro, permitieron observar que, dependiendo de su madurez, éstas pueden ser tetrarcas, (Fig. 3) pentarcas y hasta poliarcas (Fig. 4). Estos resultados difieren de los encontrados por Riopel y Steevens (83), quienes mencionaron que las raíces

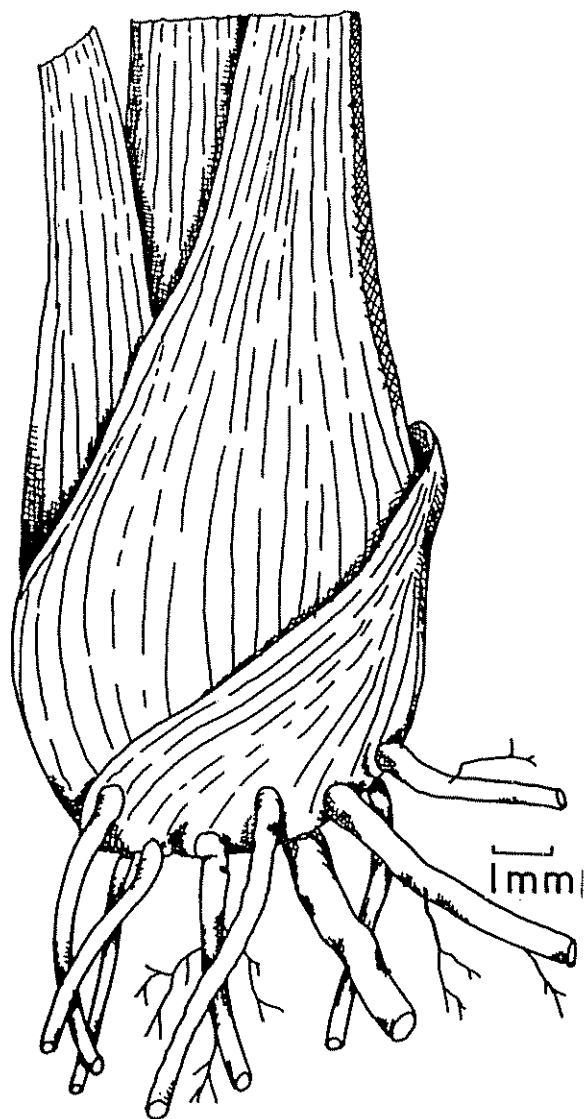


Figura 2. Parte basal de una planta in vitro con seis semanas de incubación mostrando la inserción de sus raíces adventicias en la parte inferior del cormo (cv. Gran Enano).

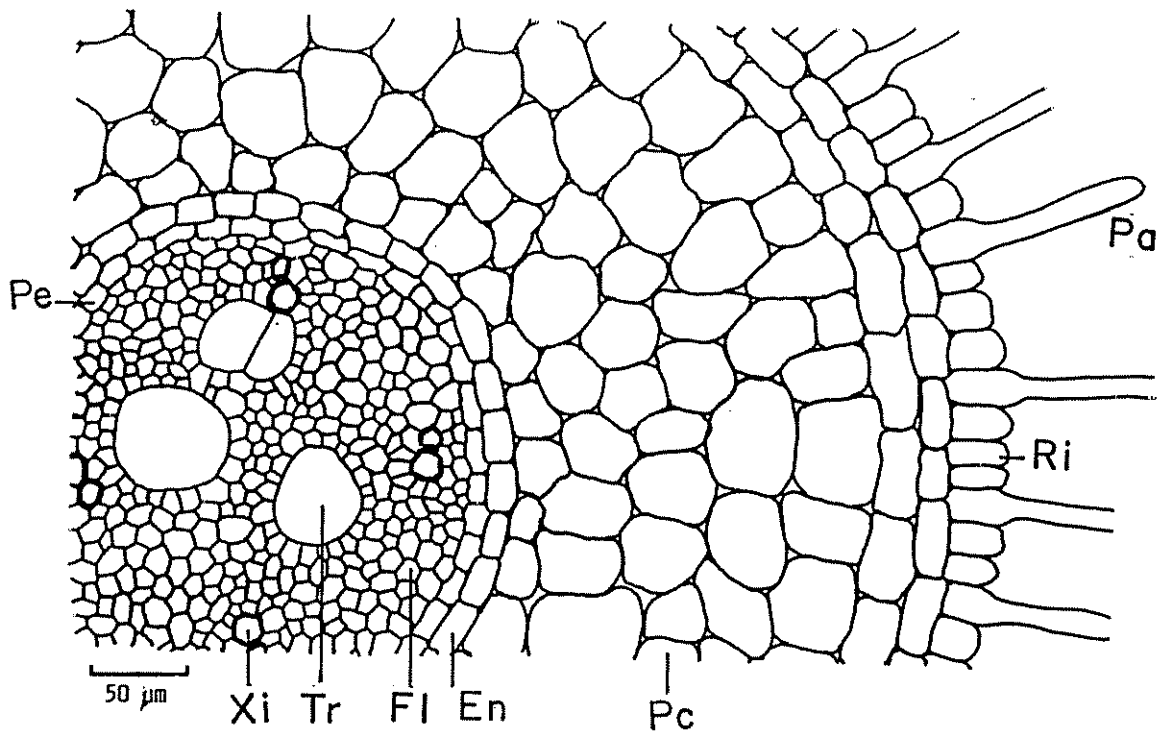


Figura 3. Sección transversal de una raíz joven (tetrarca) *in vitro* desarrollada fuera del medio semisólido (cv. Gran Enano).

En	Endodermis
Fl	Floema
Pa	Pelo absorbente
Pc	Parénquima cortical
Pe	Periciclo
Ri	Rizodermis
Tr	Tráquea en formación
xi	Xilema

de Musa son todas poliarcas, con un número de cordones de xilema que varia desde los 28 a 34 en las raíces más gruesas. La disposición poliarca es característica de las raíces adventicias en gran parte de las monocotiledóneas (39). No obstante, en esta investigación se encontró variación en este patrón. Esau (39) señaló que los cambios en las raíces, desde triarcas hasta poliarcas, no son usuales, pero que se han observado en algunas dicotiledóneas. Además, manifestó que frecuentemente el número de cordones xilemáticos es mayor en el extremo proximal (basal), que en el extremo distal (apical) de una determinada raíz; pero que también se puede presentar la disposición contraria. En este trabajo se observó que generalmente las partes más delgadas y jóvenes de las raíces in vitro eran tetrarcas, en su parte media pentarcas y en su parte proximal poliarcas. También se notó que los elementos de floema se encuentran dispersos en el cilindro vascular.

En cuanto a pelos radicales, no hay un patrón de distribución definido (Fig. 4). La base de las células que se transforman en pelos es piriforme (Fig. 4) y a veces con terminaciones agudas, en las cuales se encuentra el núcleo.

La rizodermis está formada de células pequeñas, con paredes no muy engrosadas. Se presenta a veces, en la parte más vieja, una ligera cutinización. Este fenómeno puede observarse ocasionalmente también en el estrato más externo de la corteza.

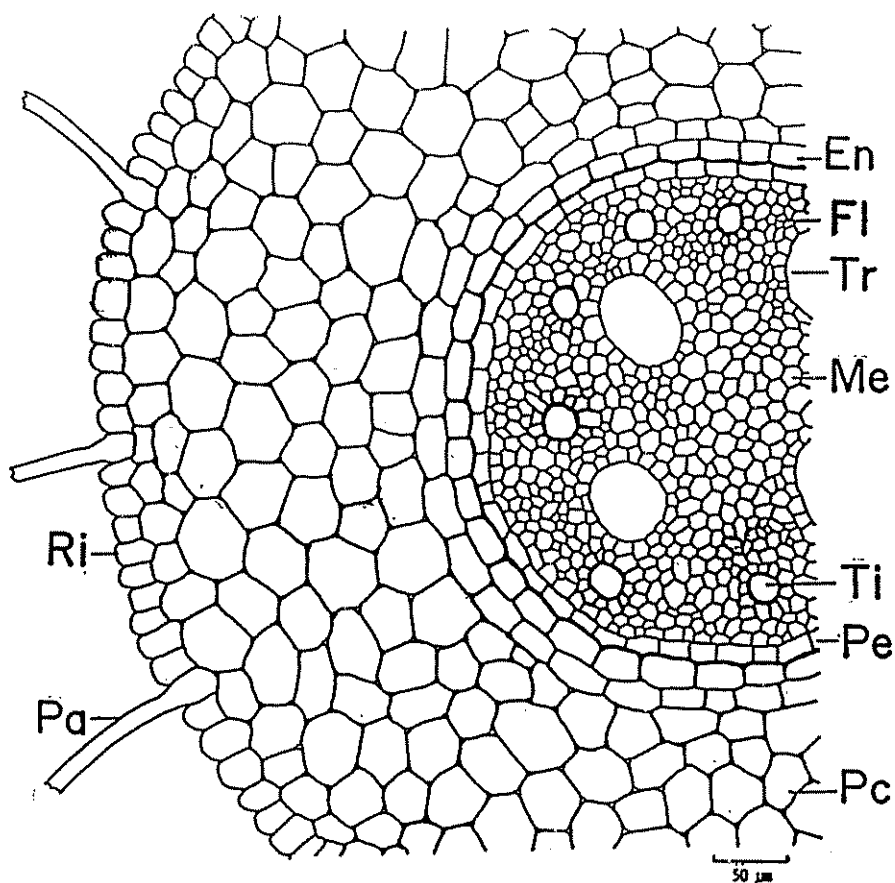


Figura 4. Corte transversal de una raíz poliarca casi madura de una planta in vitro desarrollada en medio semisólido (cv. Gran Enano).

En	Endodermis
Fl	Floema
Me	Medula aún sin lignificación
Pa	Pelo absorbente
Pc	Parénquima cortical
Pe	Periciclo
Ri	Rizodermis
Ti	Traqueida del protoxilema
Tr	Tráquea escalariforme del metaxilema en formación

Cortes transversales de raíces gruesas permitieron la observación de aerénquima en la parte de la corteza (Fig. 5). Los espacios aeríferos son lisígenos y se sitúan a partir de varios estratos de células del parénquima cortical interno hacia afuera de la endodermis. En las raíces jóvenes los espacios aeríferos se encuentran frecuentemente en un número inicial de cuatro, aumentando su número en una raíz más madura. Sin embargo, la mayoría de las raíces no los tienen. Estos resultados difieren en parte de los encontrados por Riopel y Steeves (83), quienes manifestaron que los espacios aeríferos en la corteza siempre están presentes en las regiones maduras de la raíces. Los canales o espacios aeríferos no están en correlación numérica con los cordones de xilema del haz vascular. El parénquima interno de la corteza tiene espacios intercelulares que faltan en el parénquima cortical externo (Fig. 5).

En raíces jóvenes la endodermis consta de una capa de células muy uniformes, con muy poco engrosamiento (Fig. 4), sin cutinización.

En la parte interna de la endodermis existe un periciclo uniseriado, con células a veces bastante irregulares en tamaño (Fig. 5). Los inicios de las raíces laterales presentan células muy pequeñas que no alcanzan la vigésima parte de una célula adulta de esta misma parte en la raíz madre. El origen de las raíces laterales en Musa es, a partir del periciclo. En la Figura 6 se observa la

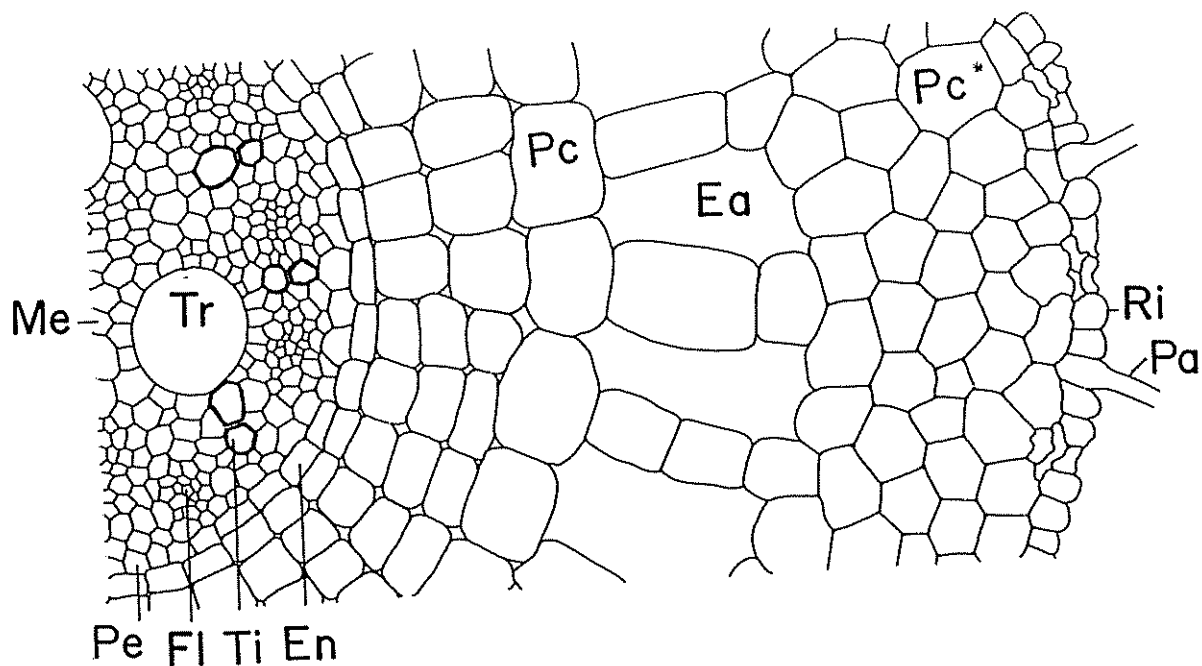


Figura 5. Parte proximal de una raíz vieja (gruesa) de una planta in vitro desarrollada en medio semisólido mostrando aerénquima lisígeno (cv. Gran Enano).

Ea	Espacio aerífero
En	Endodermis
Fl	Floema
Me	Medula
Pa	Pelo absorbente
Pc	Parénquima cortical interno
Pc*	Parénquima cortical externo
Pe	Ferociclo
Ri	Rizodermis
Ti	Traqueida del protoxilema
Tr	Tráquea en formación

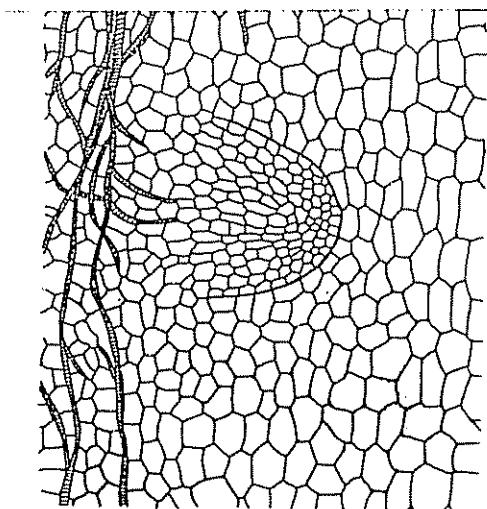


Figura 6. Iniciación de una raíz lateral en el cormo de una planta in vitro (cv. Falso Cuerno).

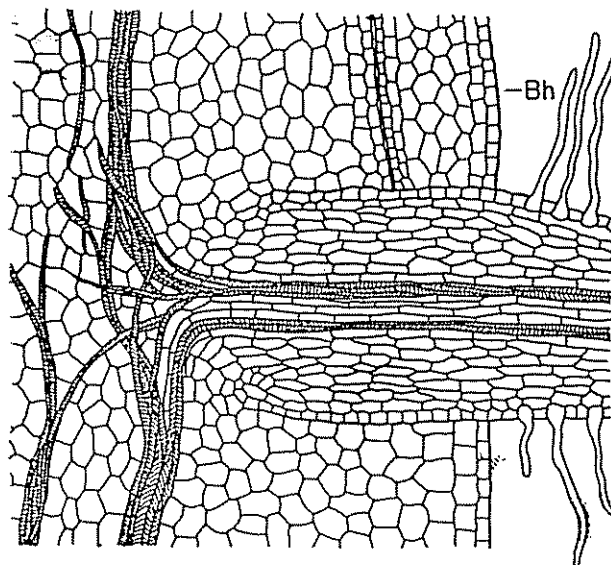


Figura 7. Raíz lateral formada en el cormo de una planta in vitro perforando la base (vaina) de una hoja (cv. Falso Cuerno).

Bh Base de la hoja

iniciación de una raíz lateral en la parte inferior del cormo y atraviezan la base de las vainas (Fig. 7).

En las partes más viejas de ciertas raíces se observa que algunas células de la endodermis evidencian una ligera cutinización.

El centro de la raíz no muestra engrosamiento de las paredes, como ocurre en raíces muy viejas de campo. Entre estas células se encuentran las partes xilemática y floemática del haz radical. El xilema consta de algunos elementos de protoxilema (traqueidas anilladas) varias traqueidas espiraladas y a veces tráqueas espiraladas en el metaxilema. El floema consta de células relativamente pequeñas.

A veces fue notoria la presencia de clorofila en las partes más viejas de las raíces expuestas a la luz. Los cloroplastos están limitados a la parte externa del parénquima cortical, el cual es muy regular. Aunque este tipo de plastidios es característico del tejido fotosintético, concretamente del mesofilo y otras partes verdes de las plantas, también es posible encontrarlo ocasionalmente en tejidos profundos, de células parenquimatosas que no están expuestas a la luz (39). Rosner y colaboradores, citados por George y Sherrington (48), opinaron que en condiciones in vitro los cloroplastos pueden convertirse en amiloplastos. Esau (39) manifestó que los leucoplastos (amiloplastos) pueden ser cloroplastos en sus primeras etapas de desarrollo y que luego se despigmentan.

Secciones longitudinales del ápice de las raíces permitieron corroborar la presencia de una caliptra con un caliptrógeno bien formado, que se asemeja en mucho al prototipo de gramíneas (39). Se nota mucha actividad meristemática en el caliptrógeno, con las células de la caliptra desorganizándose luego hacia afuera. Las células localizadas directamente atrás y encima del caliptrógeno son pequeñas y sin vacúolo (Fig. 8). El resto del ápice consta luego de células relativamente grandes. En la caliptra, cerca de la punta, se encuentran células con granos de almidón, cuya función probable es de estatolitos o sensores de gravedad (Fig. 8). Estudios en otro tipo de plantas confirman esta interpretación (39, 79). En las raíces que se orientan hacia arriba en el frasco de cultivo (presentan gran cantidad de pelos radicales) también se observó la presencia de granos de almidón, pequeños, granulados y aglutinados alrededor del núcleo. Debido a la orientación de las raíces en las que se encuentran probablemente no funcionan como estatolitos.

En la parte más vieja del ápice se distingue bien el periblema que consta de cuatro estratos de células, seguido por el pleroma (Fig. 8).

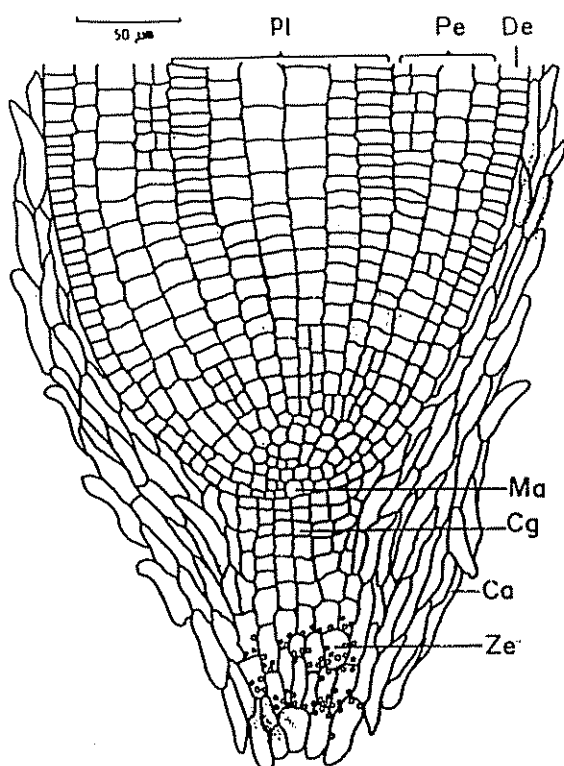


Figura 8. Sección longitudinal del ápice de una raíz de una planta in vitro (cv. Falso Cuerno)

Ca	Caliptra
Cg	Caliptrógeno
De	Dermatógeno
Ma	Meristema
Pe	Periblema
Pl	Pleroma
Ze	Zona de estatolitos



Figura 9. Corte longitudinal a través de la parte apical del corno de una planta in vitro, indicando las bases foliares, las ramificaciones y el recorrido de los haces-cilios vasculares con los rastros foliares (cv. Falso Cuerno).

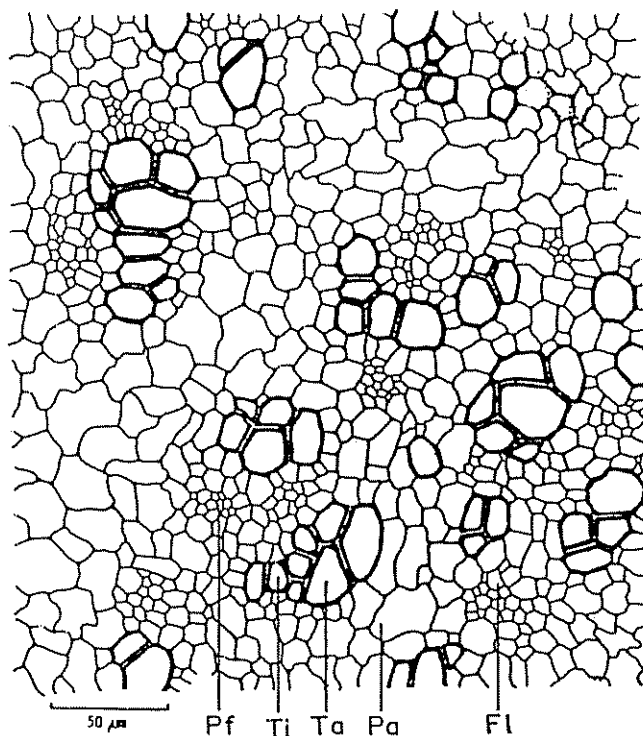


Figura 10. Corte transversal de la parte central del cormo de una planta in vitro indicando la distribución de los haces cilios vasculares (cv. Pelipita).

Fl	Floema
Pa	Parénquima
Pf	Protofloema
Ta	Tráquea del metaxilema
Ti	Traqueida del protoxilema

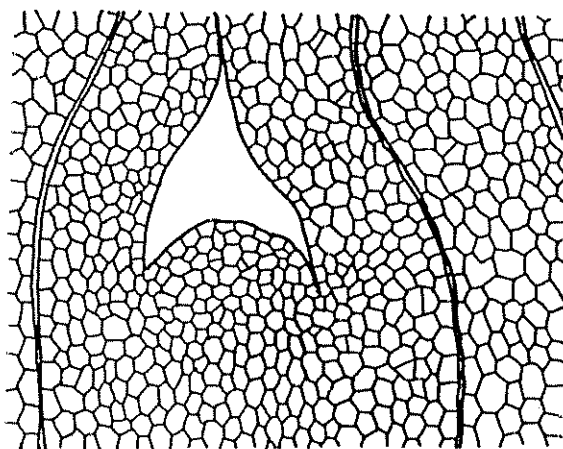


Figura 11. Corte longitudinal por el ápice de una planta in vitro (cv. Falso Cuerno).

4.1.2. Morfología y anatomía del cormo

El cormo desarrolla hojas en su parte superior y raíces adventicias en la inferior. Esto corrobora la definición enunciada por Font Quer (44). El cormo es superficialmente de color café y cremoso internamente. Al quitar las vainas foliares circundantes se localiza el ápice vegetativo, de color blanco y de superficie lisa. Su tamaño aproximado es de 0,5 a 1 mm.

Mediante cortes longitudinales (Fig. 9) y transversales (Fig. 10), se notó la región cortical y el cilindro central, donde se observó gran cantidad de granos de almidón dispersos en el tejido parenquimatoso. Muy evidente también es el recorrido sinuoso e irregular de los haces vasculares (Fig. 9). Esta disposición irregular de haces en el cormo ya ha sido observada por otros investigadores (65, 90, 96) en plantas en condiciones ex vitro.

El meristema es típico, con su domo y los respectivos primordios foliares rodeándolo (Fig. 11).

4.1.3. Morfología y anatomía de hojas

Plantas con 45 días de permanencia en cultivo, en un medio MS para crecimiento, presentan un número promedio de 5 a 6 hojas (Fig. 12). El tamaño de éstas oscila desde 6 mm en su parte más ancha, hasta 20 mm de largo desde la base hasta su ápice en las hojas más pequeñas. Las hojas más desarrolladas pueden alcanzar unos 15 mm en su parte más ancha y más de 50 mm de largo. El ancho del semilimbo

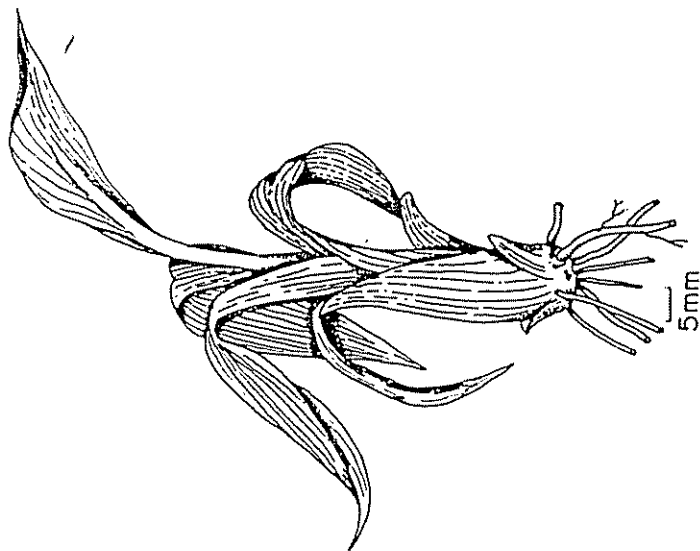


Figura 12. Planta in vitro desarrollada en un medio semisólido con una concentración de citocinina baja (0,5 mg/l) (cv. Falso Cuerno).

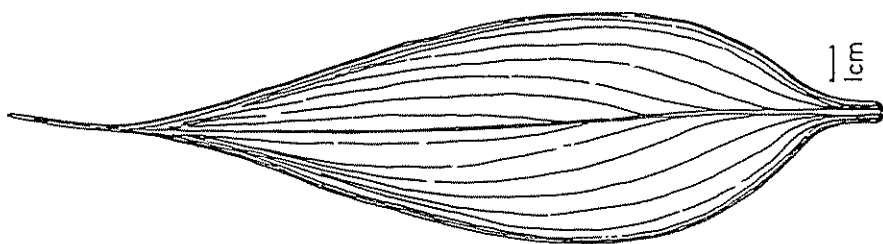


Figura 13. Hoja completamente desarrollada de una planta in vitro con la nervación típica (cv. Falso Cuerno).

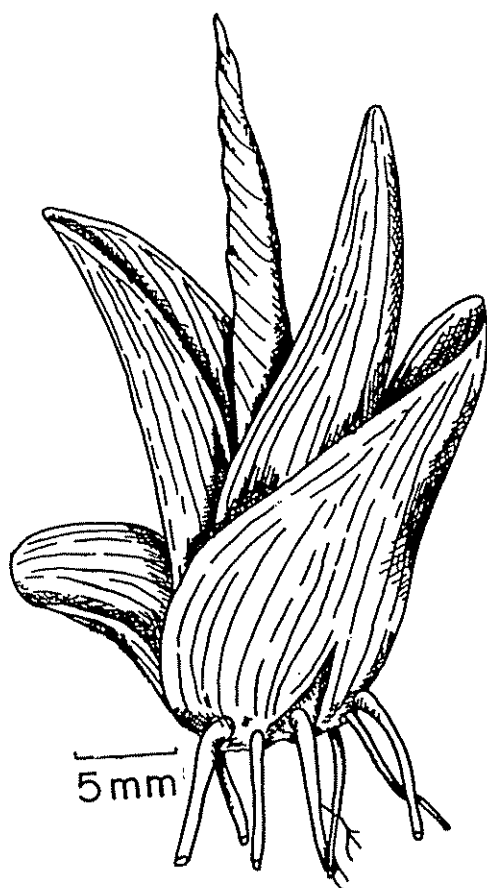


Figura 14. Planta in vitro desarrollada en un medio semisólido a las cuatro semanas de incubación con una concentración de cito-
cinina alta (4 mg/l) (cv. Falso Cuerno).

derecho es igual al del semilimbo izquierdo. En general las hojas son lanceoladas (Fig. 13), de color verde, el cual es más acentuado por la haz que en el envés, que es ligeramente glauco, de superficie brillante. Sin embargo, la forma de la hoja depende mucho de la concentración de citocinina en el medio (Fig. 14).

La vena central es conspicua en ambas caras de la hoja, siendo más evidente por la cara abaxial, (semicircular) y casi lisa por la haz. A partir de la nervadura central se inician las venas laterales (Fig. 15). Estas, en la base de la hoja, toman una posición curva y ascendente (ángulo 25-30°) hasta el centro del limbo y luego, a partir de las 2/3 partes hacia el ápice, continúan en forma casi paralela (Fig. 13). Tratamientos de diafanización de la hoja permitieron observar que existen anastomosis entre las venas laterales principales. Estas anastomosis son más frecuentes hacia el ápice foliar, donde son responsables de la disminución gradual del número de venas. Las anastomosis pueden ocurrir mediante desviación y fusión de venas, terminaciones ciegas, uniones laterales o simple división. Se observaron también hacecillos conductores que tienen una terminación ciega o prosiguen a través de anastomosis. En la base de la hoja las venas pasan hasta la transición pecíolo-vaina.

El borde de las hojas no presenta cloroplastos, no posee antocianos y mide aproximadamente 1 mm de ancho (Fig. 16). La lámina foliar termina en un apéndice fili-

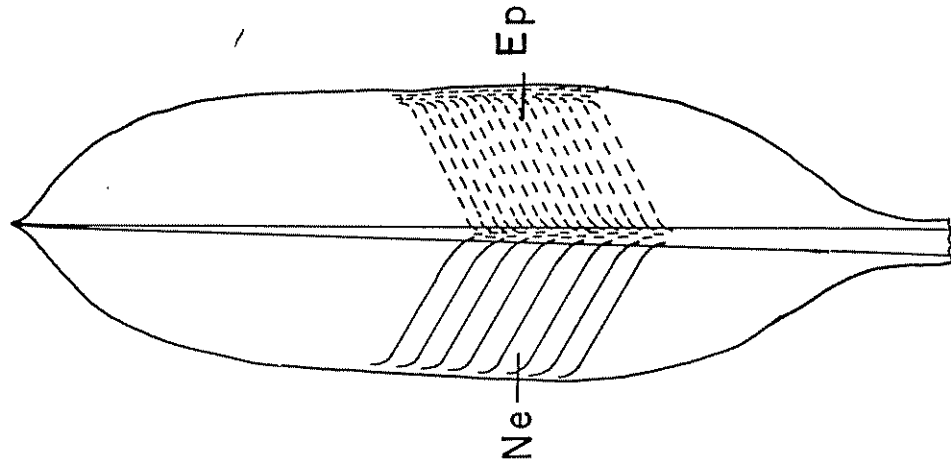


Figura 15. Dibujo esquemático de la relación entre la nervación (Ne) y orientación de las células epidermiales correspondientes (Ep) en una hoja in vitro.

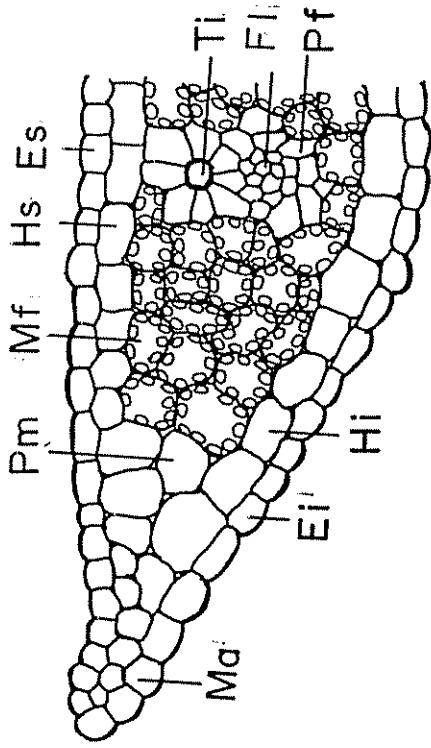


Figura 16. Borde de una hoja completamente desarrollada de una planta in vitro formada en un medio semisólido con una concentración de citocinina alta (4mg/l)(cv. Falso Cuerno).

- | | |
|----|----------------------------------|
| Ei | Epidermis inferior |
| Es | Epidermis superior |
| Fi | Floema |
| Hi | Hipodermis inferior |
| Hs | Hipodermis superior |
| Ma | Margen foliar |
| Mf | Mesofilo sin diferenciar |
| Pf | Parénquima fascicular |
| Pm | Parénquima incoloro del mesofilo |
| Ti | Traqueida |

forme, vivo y persistente, que mide aproximadamente 3 mm de longitud en las hojas más desarrolladas (Fig. 13).

La parte basal de las hojas es simétrica, indistintamente del genoma (Fig. 13). No hay un peciolo debidamente diferenciado y en consecuencia las láminas foliares tienden a traslaparse con las vainas que forman el incipiente pseudotallo (Figs. 12, 14). A 1,5 cm de la base de la planta (cormo), el conjunto de las vainas imbricadas posee un diámetro promedio de 4 a 6 mm.

Existe en estas plantas latex en las vainas y también en los limbos desarrollados, especialmente en la región de la vena central.

Cortes transversales de hojas de plantas cultivadas in vitro permitieron observar que la anatomía es la típica para una hoja de monocotiledóneas, pero con presencia de ciertas particularidades (Figs. 17, 18). La estructura de las hojas in vitro es semejante a la presentada por hojas de plántulas provenientes de semilla (Musa balbisiana), en sus primeros estadios de desarrollo. La cutícula es muy delgada. Estudios con microscopio electrónico de barrido permitieron observar que la cutícula de la epidermis adaxial y abaxial tienen poca cantidad de cera (Fig. 19). Resultados similares han sido mencionados por otros autores en otras especies (50, 51, 88, 99, 100). No se observó en ninguna hoja la presencia de células correspondientes a una banda pulvinular (Fig. 20).

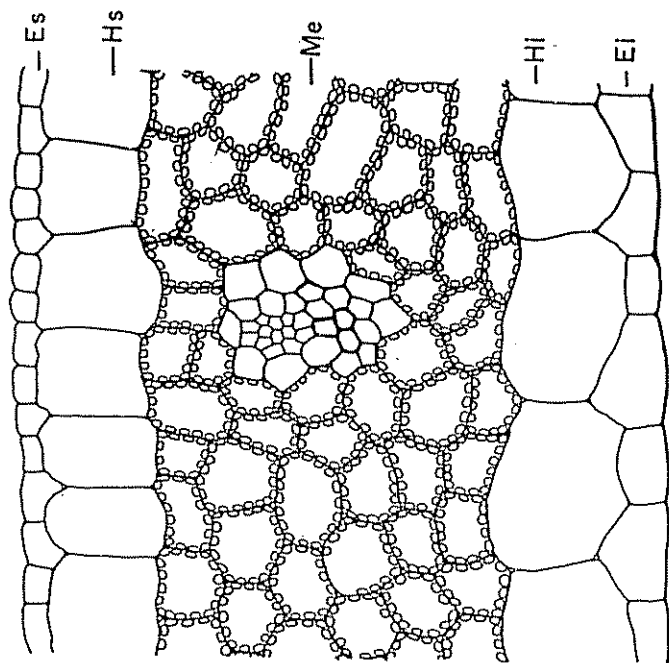


Figura 17. Corte transversal de una hoja completamente desarrollada de una planta in vitro formada en un medio con una concentración de citocinina alta (4 mg/l) (cv. Falso Cuerno).

Ei Epidermis inferior
 Es Epidermis superior
 Hi Hipodermis inferior
 Hs Hipodermis superior
 Me Mesofilo con parénquima uniforme que no muestra subdivisión en parénquima en empalizada y esponjoso

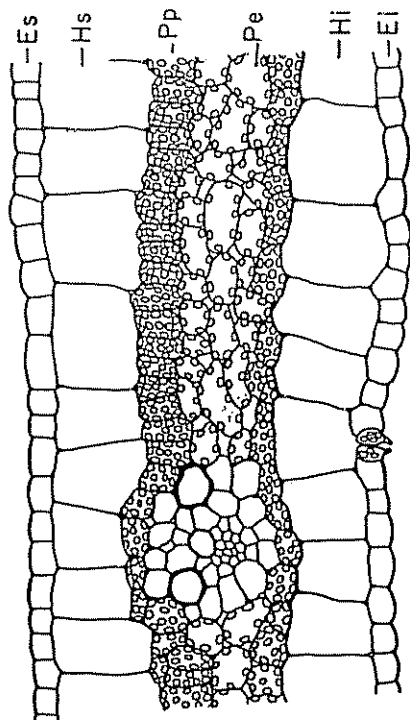


Figura 18. Corte transversal de una hoja completamente desarrollada de una planta in vitro formada en un medio con una concentración de citocinina relativamente baja (1 mg/l) (cv. Falso Cuerno).

Ei Epidermis inferior
 Es Epidermis superior
 Hi Hipodermis inferior
 Hs Hipodermis superior
 Pe Parénquima esponjoso
 Pp Parénquima en empalizada (rudimentario)

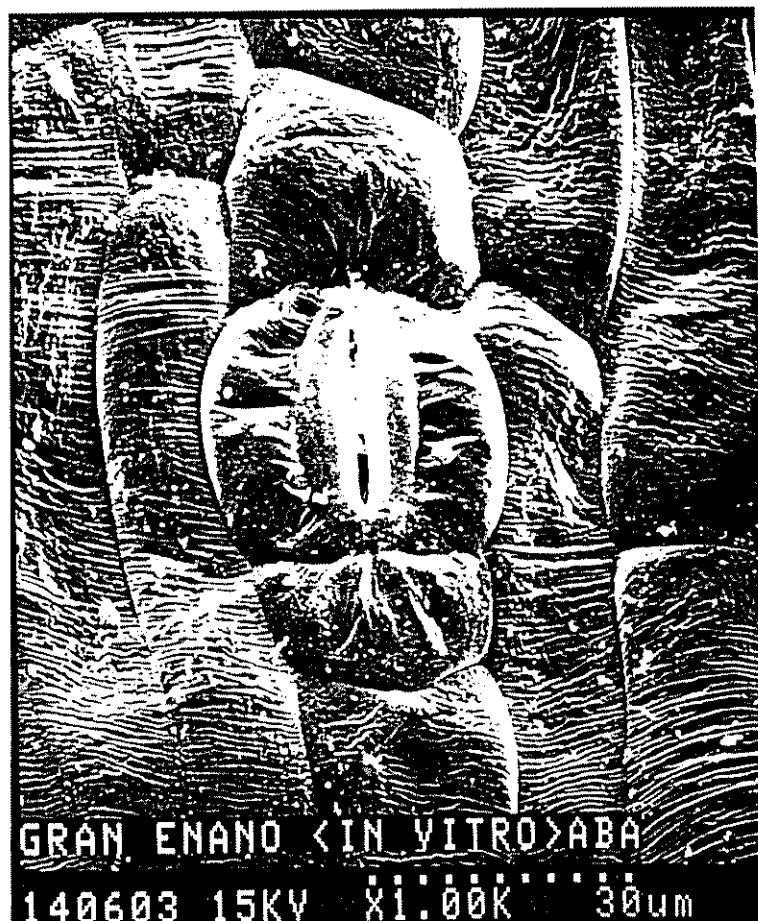
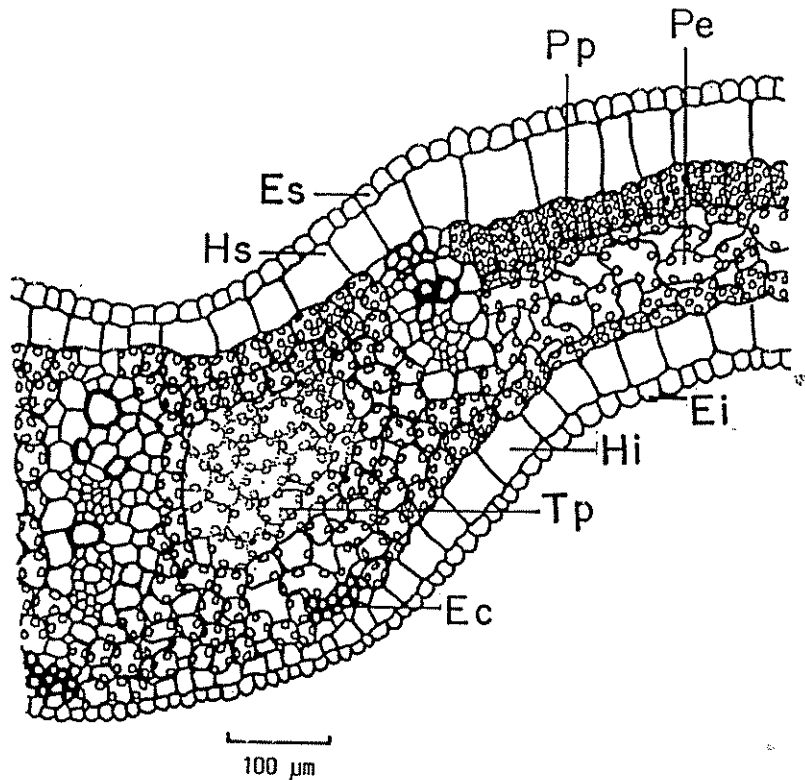


Figura 19. Superficie foliar (lado abaxial) de una hoja desarrollada en condiciones in vitro. La superficie estriada de las células epidermales muestra muy poca presencia de cera epicuticular (cv. Gran Enano).



/ Figura 20. Corte transversal de la región de la vena central de una hoja in vitro completamente desarrollada. En la vena central se observan alvéolos recubiertos de parénquima esponjoso (cv. Falso Cuerno).

Ec	Esclerénquima
Ei	Epidermis inferior
Es	Epidermis superior
Hi	Hipodermis inferior
Hs	Hipodermis superior
Pe	Parénquima esponjoso
Pp	Parénquima en empalizada
Tp	Tapete de parénquima esponjoso en el fondo del alvéolo

Las epidermis son unistratificadas y delgadas. Sus células son algo sinuosas; a veces irregulares en su tamaño (Fig. 21, 22). La orientación de las células epidermales sigue la orientación de las venas laterales (Fig. 14). Tanto en el lado abaxial como adaxial están constituidas por células alargadas (Figs. 21, 22). La presencia de cristales (véase p. 145, Fig. 78) de diversas formas es evidente en sus células.

La hipodermis consta de células más grandes cuya orientación es perpendicular a la de las epidermales (Fig. 23, 24)). Encima de los haces vasculares su tamaño es reducido y su forma más cuadrada.

El parénquima empalizada está restringido a una sola capa de células, semiredondas (aproximadamente 17 micrómetros de diámetro), con abundantes cloroplastos de un diámetro promedio de 8 micrómetros (Fig. 18). Este tejido sin embargo, no está bien diferenciado.

En ocasiones no se observan bandas de esclerénquima rodeando a los haces vasculares (Fig. 18). En general el tamaño de las células en los tejidos in vitro es más pequeño que en plantas crecidas en el campo. Sin embargo, hay que considerar que la permanencia in vitro está confiriendo una condición de miniaturización a las plantas. De acuerdo con lo observado, existe una relación de proporcionalidad en los tejidos presentes.

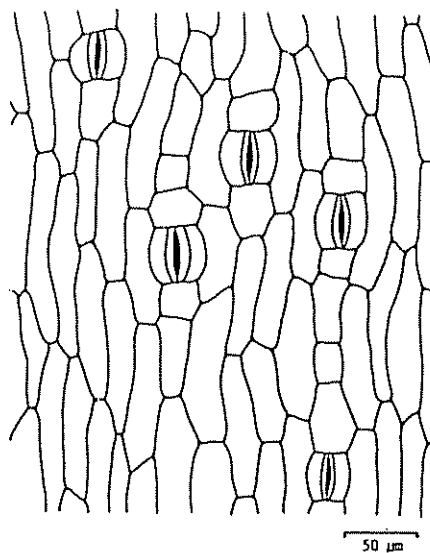


Figura 21. Forma de las células epidermales y distribución de estomas en el énvés de una hoja in vitro completamente desarrollada (cv. Falso Cuerno).

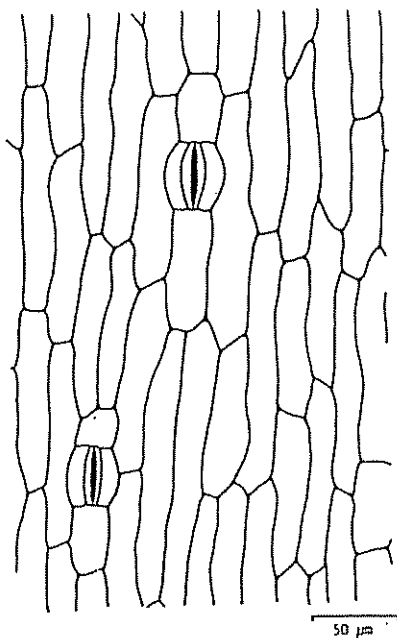


Figura 22. Forma de las células epidermales y distribución de estomas en la haz de una hoja in vitro completamente desarrollada (cv. Falso Cuerno).

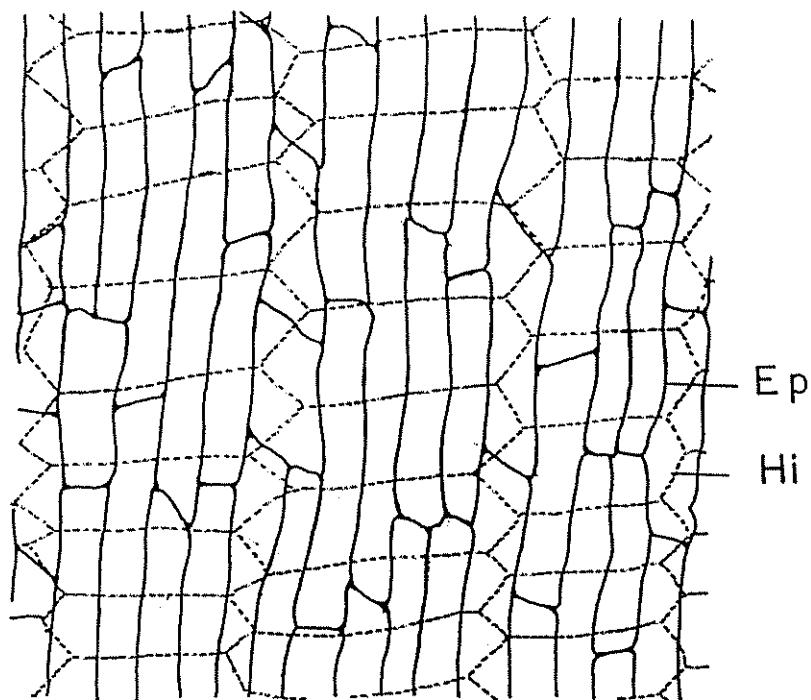


Figura 23. Esquema de la orientación de la células epidérmicas (Ep) e hipodérmicas (Hi) en el lado abaxial de una hoja in vitro.

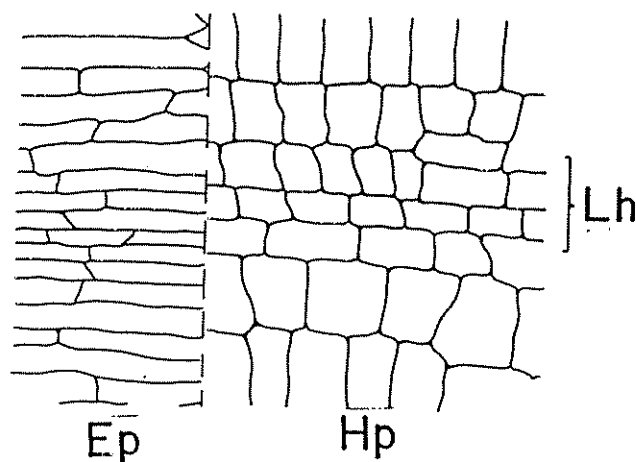


Figura 24. Esquema de la orientación de las células de la epidermis superior y de la hipodermis cerca de la nervadura central en una hoja in vitro.

Ep	Epidermis
Hp	Hipodermis
Lh	Límites laterales del haz debajo de la hipodermis

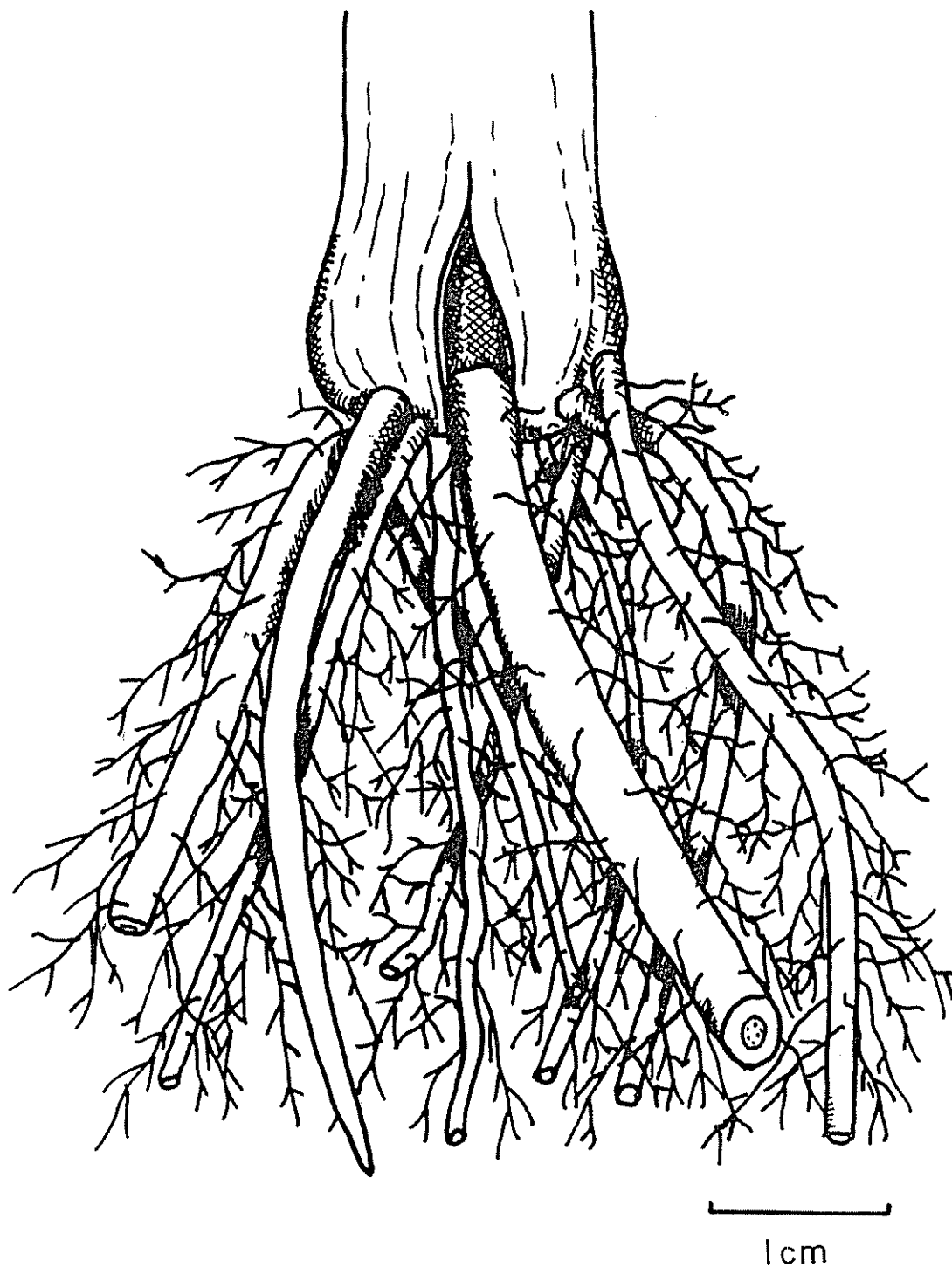


Figura 25. Sistema radical de una planta cuatro meses después de su trasplante a suelo (cv. Falso Cuerno).

Las hojas in vitro son anfiestomáticas, con una mayor cantidad de estomas en el lado abaxial (Figs. 21, 22). El tamaño promedio de los estomas para 'Gran Enano' en el lado abaxial es de 38 micrómetros de largo y 15 de ancho. Las células oclusivas están rodeadas por un grupo de 4 células subsidiarias. En su mayoría los estomas presentan su ostiolo parcial o completamente cerrado, lo cual indica poca o ninguna funcionalidad (Fig. 19). Los estomas están presentes también sobre la vena central.

En la parte basal de las hojas (vainas cerca del cormo) hay a veces presencia de cloroplastos y muchos gránulos de almidón, de forma irregular, excéntricos (véase la Fig. 85, p. 149).

Los vasos presentan engrosamiento en forma espiralada. Los engrosamientos helicoidales de las traqueidas son a veces formados por espirales múltiples.

En las vainas se observa presencia de colénquima angular y ausencia de parénquima estrellado. Además, las células parenquimáticas de la vaina poseen inclusiones tipo rafidios. A veces se visualizan dos paquetes de rafidios dentro de un mismo espacio aerífero. Estas inclusiones posiblemente son productos finales de los procesos metabólicos celulares (39). En Musa se ha comprobado que éstas inclusiones son en su mayoría de oxalato de calcio (16).

4.2. Plantas en aclimatación

Hay importantes diferencias entre plantas desarrolladas in vitro y las que crecen en condiciones de invernadero. Seguidamente se describen los resultados obtenidos en plantas de Musa en fase de aclimatación. Se presentan resultados concernientes a la morfología y anatomía de raíces, cormo y hojas.

4.2.1. Morfología y anatomía de raíces

En promedio una planta después de permanecer dos meses en aclimatación presenta 7 raíces gruesas (Fig. 25), con un diámetro promedio, en su parte proximal, de 4 mm y de 2 mm en su parte distal. Las raíces gruesas tienen menos raíces secundarias que las que son más delgadas (Fig. 25). Estas, de menor diámetro, forman la mayor parte del sistema radical y miden de 1 a 2 mm de diámetro en su parte posterior y anterior respectivamente y tienen gran cantidad de raíces secundarias y terciarias. Este tipo de raíces secundarias ramificadas no se observa en plantas in vitro. Todas las raíces son adventicias, en forma de cordón, flexibles y blancas cuando están recién formadas. Normalmente algunas adquieren luego una coloración café. Las raíces principales más largas miden aproximadamente 30 cm de largo. Las raíces secundarias miden de 2 a 2,5 cm de largo en raíces gruesas y hasta más de 10 cm de largo en raíces más delgadas; las terciarias raras veces sobrepasan en su largo 1 cm.

Los ápices de las raíces son muy evidentes y presentan una coloración cremosa.

El estudio anatómico permitió observar que todas las raíces principales son poliarcas. La endodermis es ligeramente cutinizada y con poco engrosamiento. El periciclo es uniseriado y está constituido por células relativamente grandes, de mayor tamaño que las células de la endodermis.

La exodermis no se distingue del resto del parénquima cortical. En las partes más maduras sus células, igual que las de los estratos corticales directamente debajo, se deforman y se cutinizan un poco; las paredes de estas células presentan puntuaciones finas y un ligero engrosamiento. No se nota una peridermis bien diferenciada. Sin embargo, hay divisiones celulares del parénquima cortical, que sugieren la formación de felógeno.

En la corteza son evidentes; espacios aeríferos lisígenos que abarcan una longitud radial de 4 a 6 células. Con relación a raíces de plantas in vitro el número de espacios aeríferos es mayor, asemejándose al número de espacios en raíces de plantas adultas en el campo, pero su tamaño es menor. En el cilindro central se observan tráqueas grandes aún sin diferenciarse completamente. Los vasos grandes son escalariformes.

La caliptra es grande. En las células del ápice se observan gránulos de almidón que posiblemente tienen función

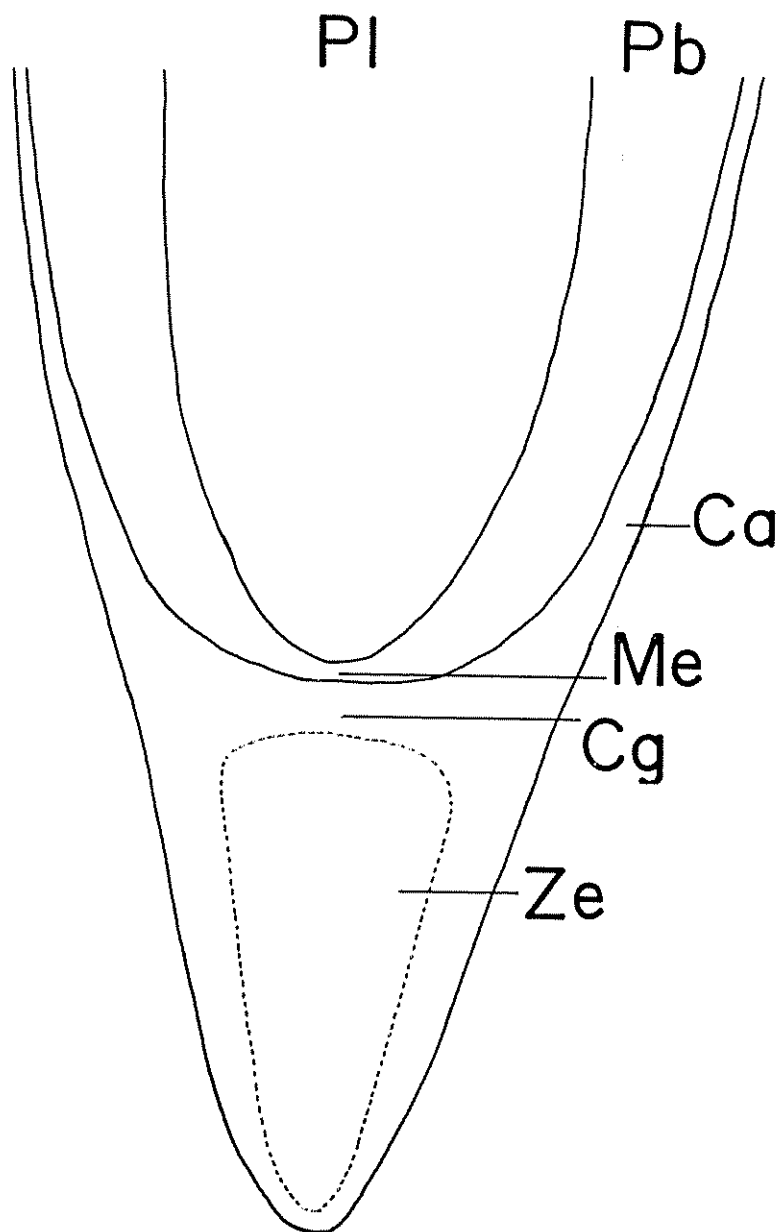


Figura 26. Diagrama del ápice de una raíz en aclimatación con la zona de estatolitos muy desarrollada.

Ca	Caliptra
Cg	Caliptrógeno
Me	Meristema
Pe	Periblema
Pl	Pleroma
Ze	Zona de estatolitos

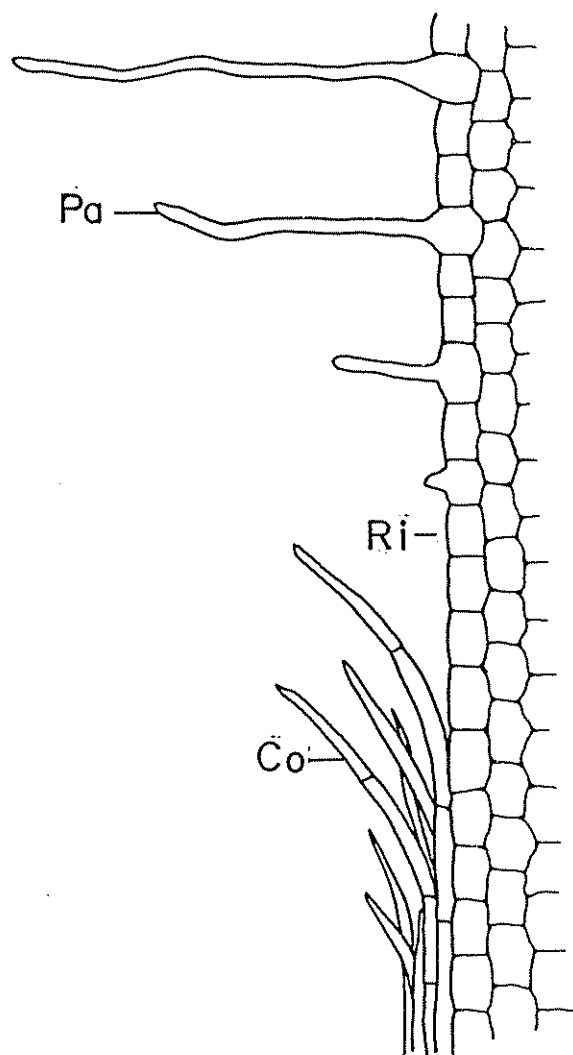


Figura 27. Corte longitudinal de la parte externa de una raíz de una planta con cuatro meses de aclimatación por la zona de transición entre cofia e iniciación de pelos absorbentes (cv. Falso Cuerno).

Co	Células de la cofia
Pa	Pelo absorbente
Ri	Rizodermis

de estatolitos (Fig. 26). Al provocar una reacción con iodo macroscópicamente es posible observar una zona de coloración azul morada en la punta del ápice. El espesor de la caliptra, a la altura del meristema, es de unas seis hileras de células alargadas e hialinas. Las células en la parte distal son más alargadas, luego se desprenden por completo de la rizodermis, en la cual, después, se inicia la formación de los pelos absorbentes (Fig. 27). El pleroma consta de unas 30 hileras de células a lo ancho y el periblema unas 25 hileras de células, en diferencia con raíces de plantas in vitro, donde el periblema y el pleroma están constituidos por menor número de hileras de células.

4.2.2. Morfología y anatomía del cormo

El cormo desarrolla en la parte superior follaje. Entre las bases foliares circundantes se localiza el punto vegetativo que en plantas con 2 a 3 meses de aclimatación mide aproximadamente 5 mm de diámetro. En plantas con 5 y 6 meses de aclimatación se empiezan a notar yemas que salen opuestas a la axila de la hoja (vaina). En plantas jóvenes la primera yema lateral aparece hacia la base del cormo, que según León (65) en cormos de plantas adultas brotan de la parte superior. Al realizar un corte longitudinal se distingue la corteza y el cilindro central, lo mismo que cicatrices de haces vasculares. Después de realizar este tipo de cortes se observó una rápida oxidación de los polifenoles.

Cortes transversales permitieron observar una proporción grande de parénquima amiláceo y el recorrido intrincado de los haces vasculares.

4.2.3.. Morfología y anatomía de hojas

Hojas de una planta de Musa con 15 días de aclimatación presentan todavía una anatomía similar a hojas in vitro. Wardle, Dobbs y Short (108) sugirieron que las hojas formadas in vitro podrían tener funcionalidad como órganos de reserva. Estos autores encontraron que hojas de plantas precultivadas in vitro se desarrollaron lentamente y luego murieron. En contraste, las hojas formadas ex vitro se desarrollaron rápidamente. En este trabajo se notó que las hojas de plantas de Musa provenientes de cultivo in vitro no murieron, pero tampoco se desarrollaron más. A los 7 días aproximadamente se observó la emergencia de la primera hoja producida en condiciones de aclimatación.

Varios autores han investigado la aclimatación de plantas/de condiciones in vitro a ex vitro (13, 15, 35, 37, 38) y de las plantas in vivo en diferentes condiciones del medio (19, 45, 68, 78). La aclimatación de plantas que han crecido en un ambiente aséptico implica la transferencia gradual a otras condiciones, como menor humedad relativa y mayor intensidad de luz (48). Wetzstein y Sommer (109, 110) indicaron que la anatomía interna y ultraestructura de plantas propagadas in vitro es diferente de plantas en invernadero o de campo. Posiblemente estos cambios expliquen su comportamiento fisiológico (88).

En hojas de plantas de Musa con dos meses en aclimatación se observó la presencia de gotas de agua de riego sobre el limbo, sugiriendo la presencia de ceras sobre la superficie de la cutícula. Contrariamente a lo observado en hojas in vitro (Fig. 19, p. 80) la cera epicuticular es más evidente, sobre todo en la cara abaxial (Fig. 28). La cera no presenta una forma definida y está distribuida por toda la superficie. En este caso, la cantidad y estructura de la cera epicuticular le confiere mayor impermeabilidad a la superficie epidérmica. La presencia de cera epicuticular aumentó en forma gradual, según la formación de nuevas hojas. Mientras que en hojas de plantas in vitro se observaron pequeños depósitos de cera, ésta fue más notoria en plantas en aclimatación y mucho más evidente en hojas adultas (Figs. 19, 28, y Fig. 73, p. 141). Estudios anteriores (46) mostraron que hojas de plantas de Musa desarrolladas en el campo, presentaron un 60% más de cera epicuticular en comparación a hojas de plantas crecidas en invernadero. Además, la forma y la cantidad de la cera varió entre representantes con genoma A y B.

La poca cantidad de cera epicuticular observada en hojas de plantas in vitro puede deberse a las condiciones de alta humedad relativa y baja intensidad lumínica. Sutter y Langhans (99) opinaron que, además de la presencia de reguladores de crecimiento en el medio, las altas temperaturas podrían afectar la producción de cera. Sin embargo, no todas las especies muestran reducida cera epicuticular in vitro y en estos casos la supervivencia al

trasplante no siempre se correlaciona con el aumento de cera ex vitro (50). Los casos de mortalidad posiblemente se deban a una inefectiva función estomática (50, 100).

En Dianthus caryophyllus (99) la presencia de cera epicuticular confirió una apariencia glauca a las hojas. El porcentaje de supervivencia correlacionó positivamente en plantas de hojas glaucas en comparación con hojas no glaucas. La falta de cera hace que las plantas, después del trasplante, pierdan agua más rápidamente. Possingham, Chamber, Radler y Grncarevic, citados por Sutter y Langhans (99), señalaron la importancia de la cera epicuticular en hojas de Vitis vinifera, donde ésta fue una efectiva barrera para el movimiento del agua a través de la cutícula, previniendo así la desecación.

Para Musa, aparentemente la baja cantidad de cera epicuticular encontrada en plantas en invernadero, en comparación a plantas en el campo, es una consecuencia de la alta humedad relativa y alta temperatura generadas en el invernadero. En plantas de invernadero la cera epicuticular no obstruye estomas, situación que se observa en hojas de plantas en el campo, lo cual podría afectar negativamente al intercambio gaseoso (46). La cera se forma a partir de la región periclinal de la cutícula y su síntesis ocurre en las células epidermales, pasando ésta a través de la cutícula hasta su superficie. Sin embargo, el mecanismo del movimiento no se conoce con exactitud (46).

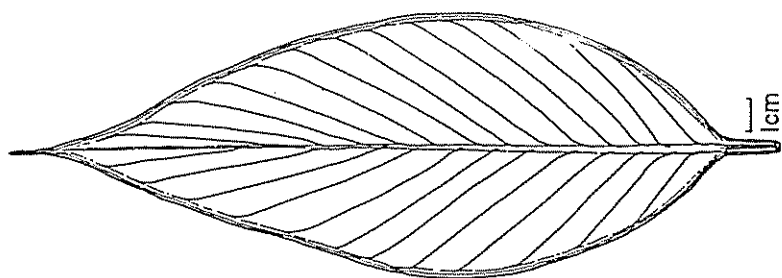


Figura 29. Hoja completamente desarrollada de una planta con tres meses de aclimatación con la nervación típica (cv. Falso Cuerno).

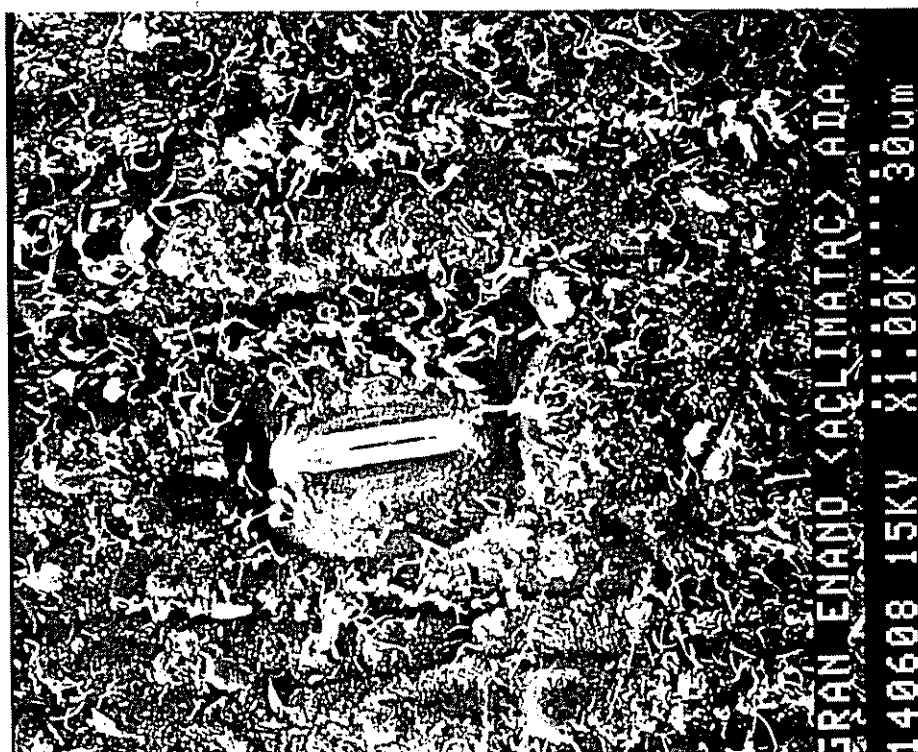


Figura 28. Superficie foliar (lado adaxial) de una hoja desarrollada durante la etapa de aclimatación. Se observa en la superficie epidermal una mayor deposición de cera epicuticular que in vitro (cv. Gran Enano).

En hojas de Musa de plantas con tres meses de permanencia en aclimatación, la disposición de las nervaduras secundarias varía en una misma hoja. Se observó que aquellas localizadas cerca de la base están separadas entre sí por un ángulo de 40° , las que se encuentran en su parte central por un ángulo de 30° y en la parte apical están dispuestas en forma casi paralela. En este caso las hojas todavía son de apariencia lanceolada (Fig. 29). Internamente se presentan cordones de esclerenquima localizados alrededor de los haces vasculares (Fig. 30). El parénquima en empalizada consta normalmente de un estrato de células alargadas seguido de otro, de células casi isodiamétricas (Fig. 35). En el parénquima esponjoso se observan muchos espacios aeríferos. Sin embargo, todavía no se nota una compartimentalización como es el caso en hojas de plantas crecidas en el campo.

En Brassica oleracea sólo fue posible observar el parénquima en empalizada después de siete semanas en aclimatación y, poco a poco, las nuevas hojas producidas mostraron una estructura interna característica de la especie (53).

En Musa los estomas en su mayoría están orientados en filas longitudinales en secuencia basípeta; hay mayor número en el envés que en la haz. En su mayor parte los estomas son funcionales y tienen cuatro células subsidiarias a su alrededor (Fig. 19). Los estomas coinciden con una cavidad subestomática en el mesófilo. En hojas formadas

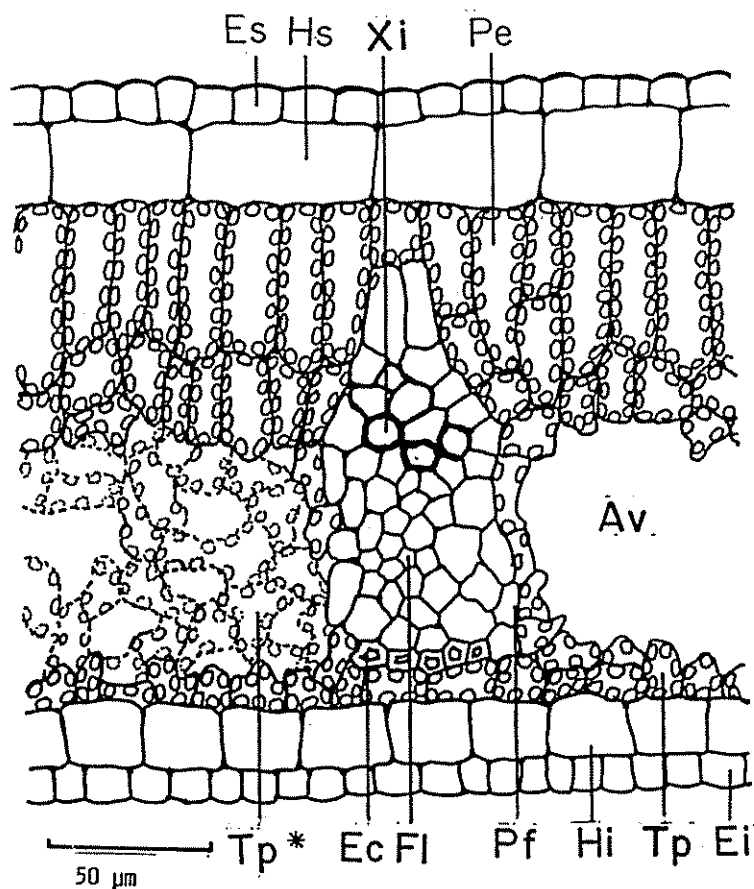


Figura 30. Corte transversal de una hoja completamente desarrollada que corresponde a la fase de transición con un haz vascular sencillo. En el alvéolo izquierdo se aprecia el parénquima esponjoso en el fondo (cv. Falso Cuerno).

Av	Alvéolo
Ec	Esclerénquima
Ei	Epidermis inferior
Es	Epidermis superior
Fl	Floema
Hi	Hipodermis inferior
Hs	Hipodermis superior
Pe	Parénquima en empalizada
Pf	Parénquima fascicular
Tp	Tapete de parénquima esponjoso
Tp*	Tapete de parénquima esponjoso en el fondo
Xi	Xilema

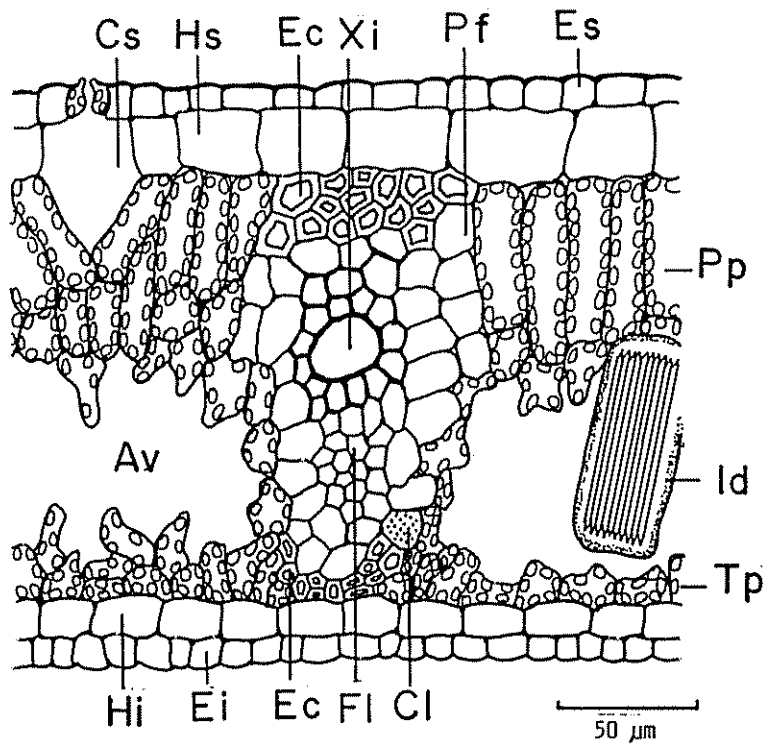


Figura 31. Corte transversal de la misma hoja que en Figura 30 con un hacesillo vascular más desarrollado e idioblasto con rafidios.

Av	Alvéolo
Cl	Canal laticífero
Cs	Cavidad subestomática
Ei	Epidermis inferior
Es	Epidermis superior
Ec	Esclerenquima
Fl	Floema
Hi	Hipodermis inferior
Hs	Hipodermis superior
Id	Idioblasto con rafidios
Pf	Parénquima fascicular
Pp	Parénquima en empalizada
Tp	Tapete de parénquima esponjoso
Xi	Xilema

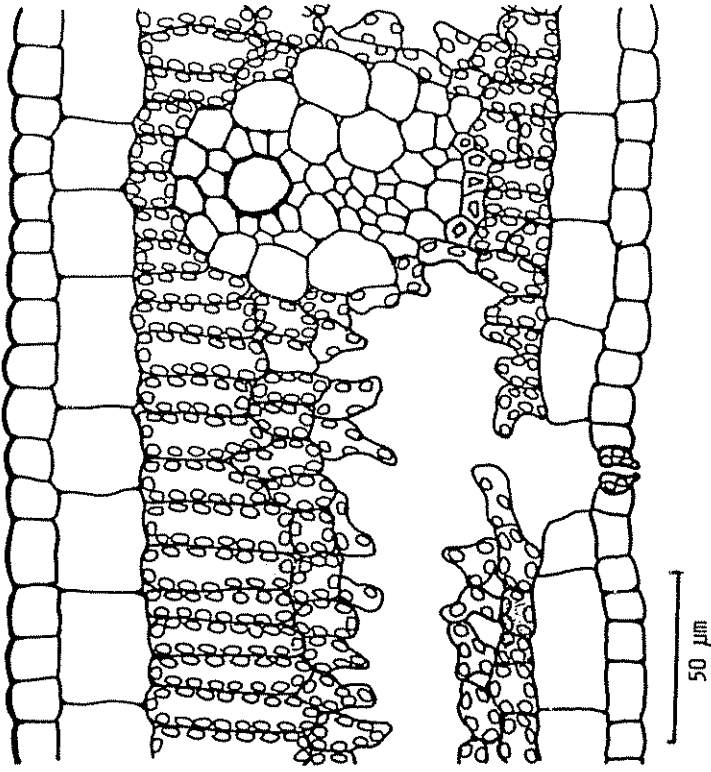


Figura 32. Corte transversal de una hoja completamente desarrollada que presenta la transición de un hacesillo vascular muy sencillo (cv. Falso Cuerno).

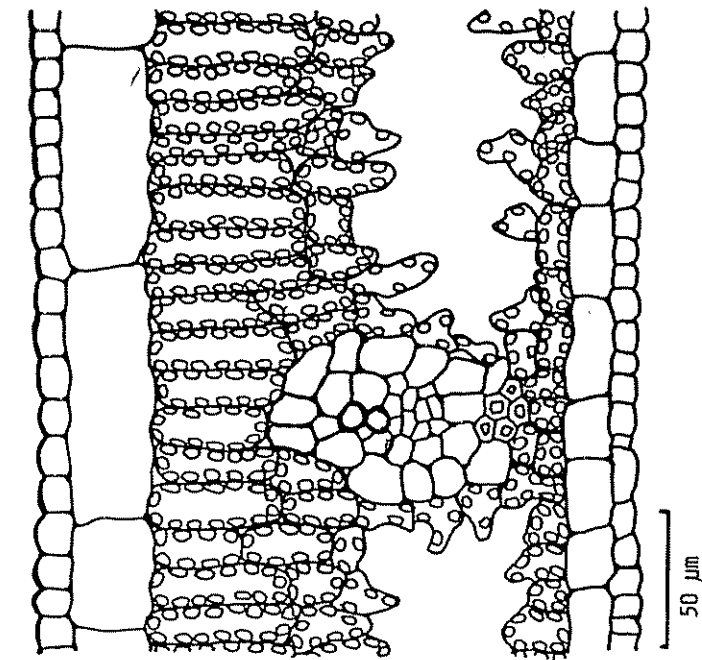


Figura 33. Corte transversal de la misma hoja que en Figura 32 donde se observa un hacesillo fibrovascular de mayor desarrollo.

después de unos 3 a 4 meses de trasplante se nota también el inicio de una compartimentalización en el parénquima esponjoso (Fig. 30). Es muy notoria la presencia de rafidios y éstos aparecen en hojas con 5 meses de aclimatación debajo de las células del parénquima en empalizada (Fig. 31). La Figura 31 muestra también el prototipo de un haz vascular bien formado de una vena secundaria. Cuando se observan venas menores sus haces vasculares son más sencillos, como lo muestra la Figura 32. Sin embargo, pueden tener una tráquea grande como se observa en la Figura 33.

A los 5 meses es evidente que las células de la hipodermis son mucho más grandes que las de la epidermis correspondiente. Las paredes de las células epidérmicas no son sinuosas. La cutícula está más desarrollada. Esta diferenciación de la cutícula también ha sido mencionada como una característica importante por otros autores en otras especies (14, 50, 51, 88, 109). Las cámaras aeríferas en el mesófilo son muy evidentes y se observan muchos cristales prismáticos. El parénquima en empalizada consta en algunos casos de dos estratos de células alargadas (cerca de las venas) y en otros de un estrato de células alargadas, seguido por un segundo de células casi isodiamétricas. Tres tipos de haces vasculares pueden distinguirse: primarios, secundarios y terciarios (Figs. 30, 31, 32, 33). Los primarios (Fig. 31) se extienden hasta las epidermis, pero los secundarios (Fig. 30) y los terciarios no (Figs. 32, 33), al tener una capa de células de clorénquima entre la

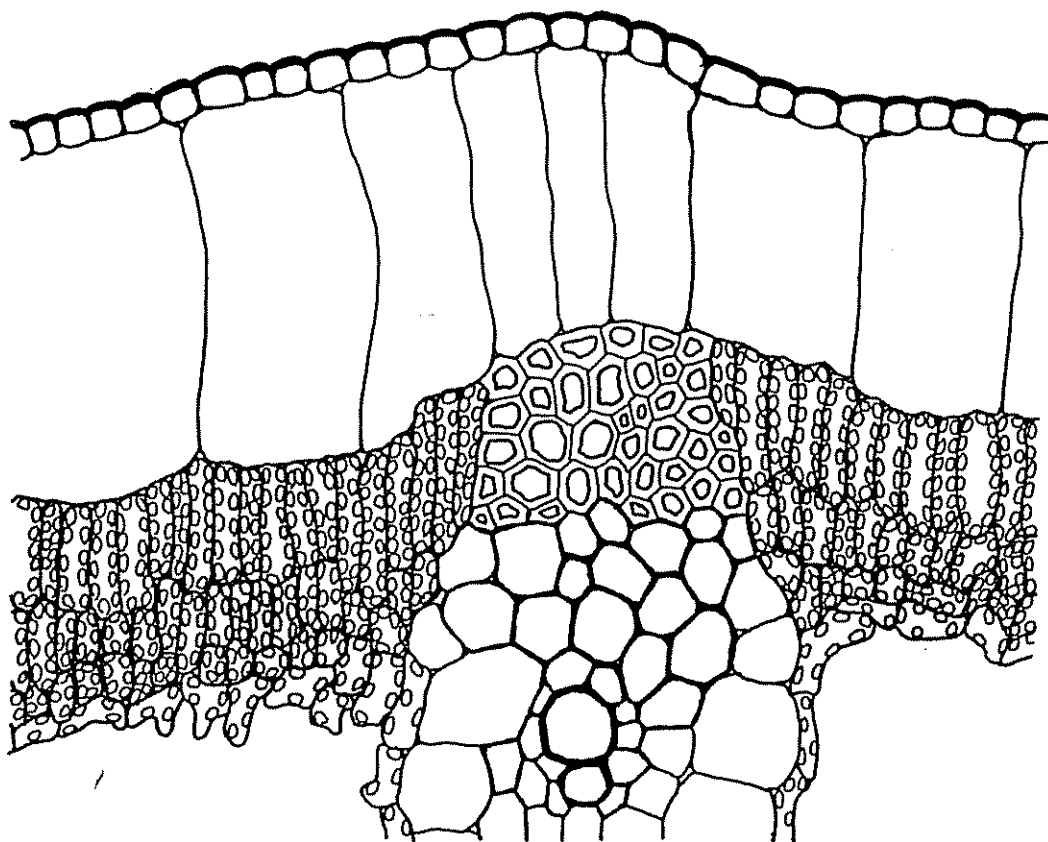


Figura 34. Corte transversal por una vena principal lateral, cerca de la nervadura central de una hoja de una planta con nueve meses de aclimatación con hipodermis superior atípica (cv. Falso Cuerno).

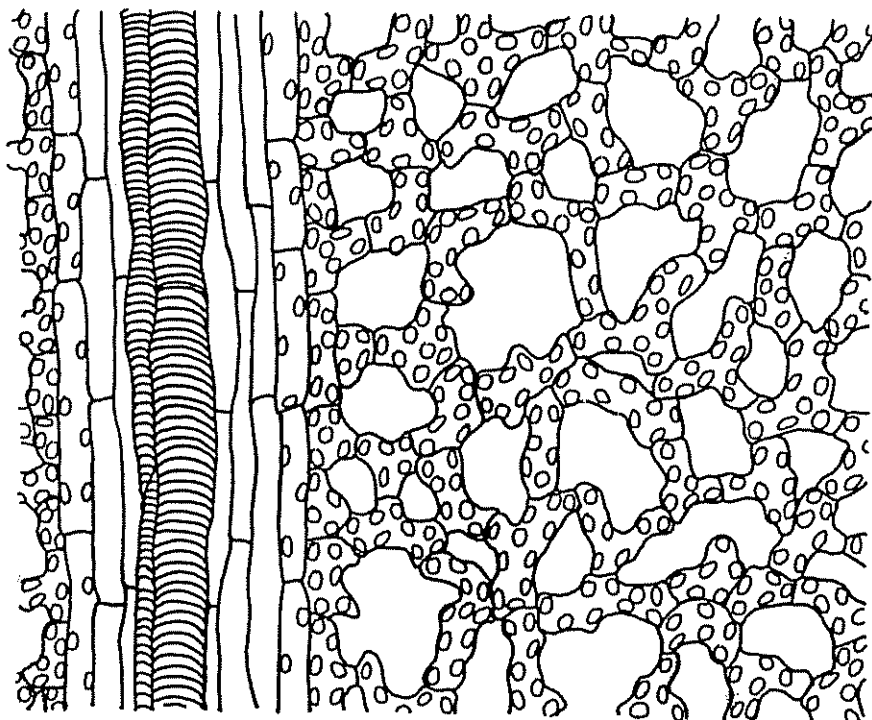


Figura 35. Corte paradermal de una hoja completamente desarrollada de una planta con dos meses de aclimatación a la altura del parénquima esponjoso. Todavía no se observa la estructura alveolar (cv. Falso Cuerno).

haz y la hipodermis. En los haces vasculares sencillos el esclerénquima se encuentra en menor cantidad que en haces de mayor tamaño. En los primarios el esclerénquima está muy bien definido, principalmente en el lado adaxial de la hoja y, consta de 6 a 12 células (Fig. 31). Las cavidades aeríferas en el centro de la hoja son muy pronunciadas y ya se nota un incipiente pulvínulo.

A los 6 y 7 meses de aclimatación las hojas todavía no presentan una estructura anatómica como la observada en hojas de plantas adultas. Pero se hace evidente, en la parte basal de la vena central, un parénquima estrellado con gran cantidad de cristales. Asimismo, el pulvínulo está completamente formado a lo largo de la vena central (véase la Fig. 75, p. 142).

Hojas formadas a los 9 y 10 meses en plantas en aclimatación presentan un parénquima en empalizada de 2 a 3 estratos, de células alargadas. Las epidermis lo mismo que las hipodermis son uniseriadas; en algunos casos se observó hipertrófia en las células de la hipodermis (Fig. 34). Esta hipertrofia también fue observada por Skutch (92). Los haces vasculares están completamente diferenciados y el esclerénquima es muy notorio (Fig. 34).

La banda pulvínular se hace muy evidente. Hay estomas presentes en la haz y en el envés, con su número disminuyéndo hacia el borde. Cortes transversales de este borde permitieron observar la presencia de un parénquima lagunoso incoloro. El haz marginal consta de varias

traqueidas (4 a 5 grandes) con esclerénquima rodeándolo. Siguen uno a dos vasos grandes (tráqueas), que están rodeados de células parénquimatosas pequeñas; hacia el borde se observa un parénquima incoloro interno de 3 a 4 estratos celulares que gradualmente se reduce a un estrato y luego desaparece por completo. Las células de la epidermis e hipodermis son muy reducidas en tamaño.

En plantas de Musa en aclimatación se observó el fenómeno de gutación, especialmente en la parte terminal de la hoja. Cuando esta región fue cortada la gutación aumentó. En otras especies la gutación ocurre generalmente a través de estructuras secretoras llamadas hidátodos activos o pasivos, a través de los cuales el líquido sale en forma de gotas desde el interior de la hoja (33, 34, 39). Sin embargo, en este estudio no se encontraron hidátodos, sino la gutación ocurrió en los puntos de ruptura de vasos grandes, sobretodo en las zonas marginales del limbo, o sea que la salida del líquido es debida a la presión radical.

4.3. Plantas en campo

Las condiciones en que se desarrollan las plantas en el campo son diferentes a las encontradas en un invernadero y más aun en un recipiente de cultivo aséptico. A continuación se describen aspectos relacionados con la morfología y anatomía de raíces, cormo y hojas de plantas adultas en el campo.

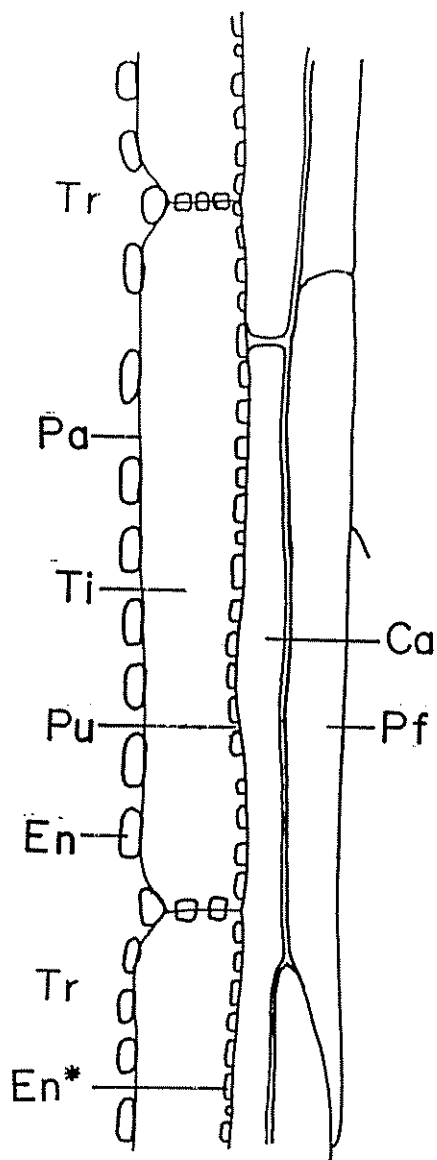


Figura 36. Corte longitudinal de parte del xilema en el extremo distal del haz concéntrico de una raíz de una planta adulta.

El lumen de la tráquea aparece a la izquierda y las traqueidas y células acompañantes a la derecha (cv. Pelipita).

Ca	Célula acompañante parénquimatosa
En	Engrosamiento de la pared de la tráquea
En*	Engrosamiento de la pared externa de la traqueida
Pa	Pared primaria
Pf	Célula del parénquima fascicular
Pu	Puntuación
Ti	Traqueida
Tr	Lumen de la tráquea escalariforme

4.3.1. Morfología y anatomía de raíces

El sistema radical de Musa es una homorrizia secundaria típica. Se observan las raíces saliendo de la parte inferior del cormo, debajo del punto de inserción de las vainas foliares. La formación de raíces es profusa. Estas son en forma de cordón, con coloración que varía de blanco a amarillo o café, dependiendo de su madurez. Las raíces principales son cilíndricas, variando su diámetro desde 5 a 10 mm aproximadamente. El grosor disminuye proporcionalmente hacia el ápice, el cual se distingue fácilmente. En algunos casos las raíces son muy largas (más de 2 metros). Las raíces primarias se ramifican en secundarias, en las cuales hay pelos absorbentes. Características morfológicas similares han sido señaladas por otros autores (22, 65, 91, 96) en el género Musa.

Las raíces son poliarcas. En cortes longitudinales se observó que los vasos del xilema primario (protoxilema) tienen paredes con engrosamientos anillados, raras veces helicoidales. Las traqueidas del metaxilema muestran transición a escalariforme con engrosamientos ligeramente lignificados ya que presentan una reacción de lignina débil. El tamaño de las tráqueas es grande. En las células que rodean la tráquea, los engrosamientos son más fuertes en las paredes anticlinales. En determinados puntos los engrosamientos pueden faltar, puesto que los engrosamientos de las células que rodean a las tráqueas grandes son irregulares en su forma. Estas células poseen engrosamiento

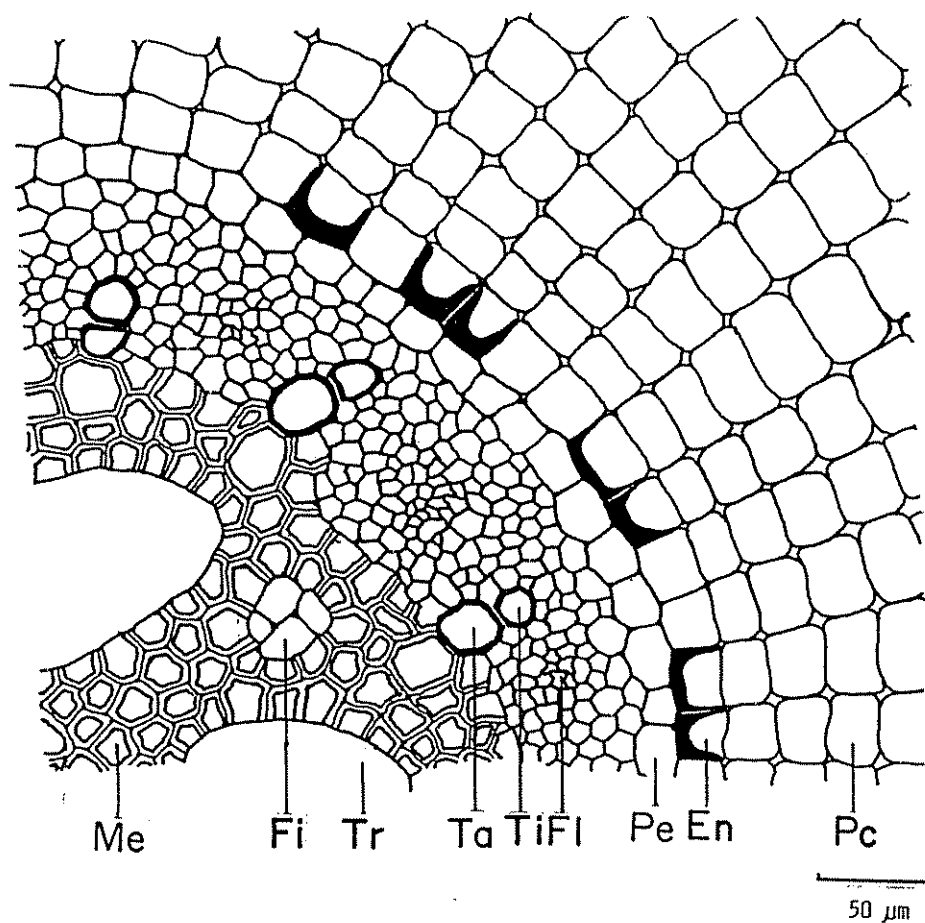


Figura 37. Corte transversal de la parte interna de una raíz madura en una planta adulta (cv. Felipita).

En	Endodermis
Fi	Floema interno
Fl	Floema
Me	Médula
Pc	Parénquima cortical
Pe	Periciclo
Ta	Tráquea
Ti	Traqueida
Tr	Tráquea interna

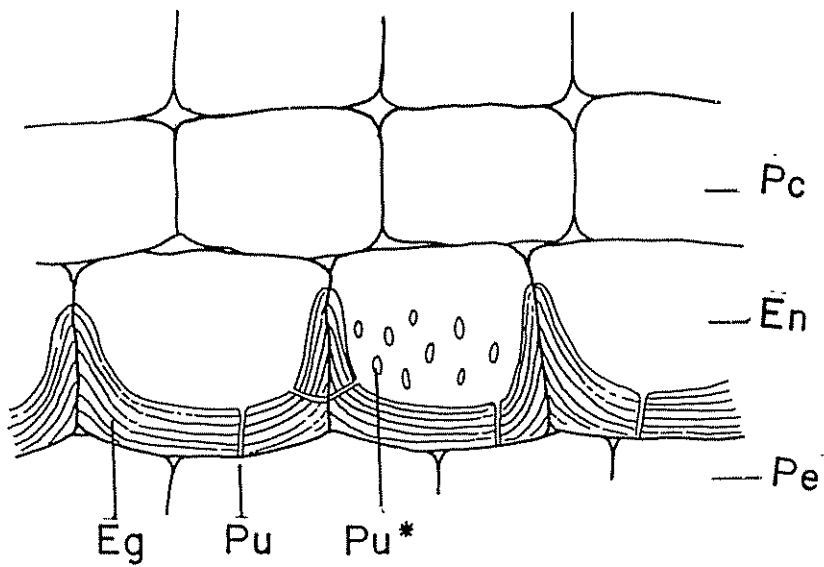


Figura 38. Detalle de un corte transversal de una raíz adulta a través de la endodermis.

En	Endodermis
Eg	Engrosamiento
Pc	Parénquima cortical
Pe	Periciclo
Pu	Puntuación hacia el periciclo
Pu*	Puntuación transversal

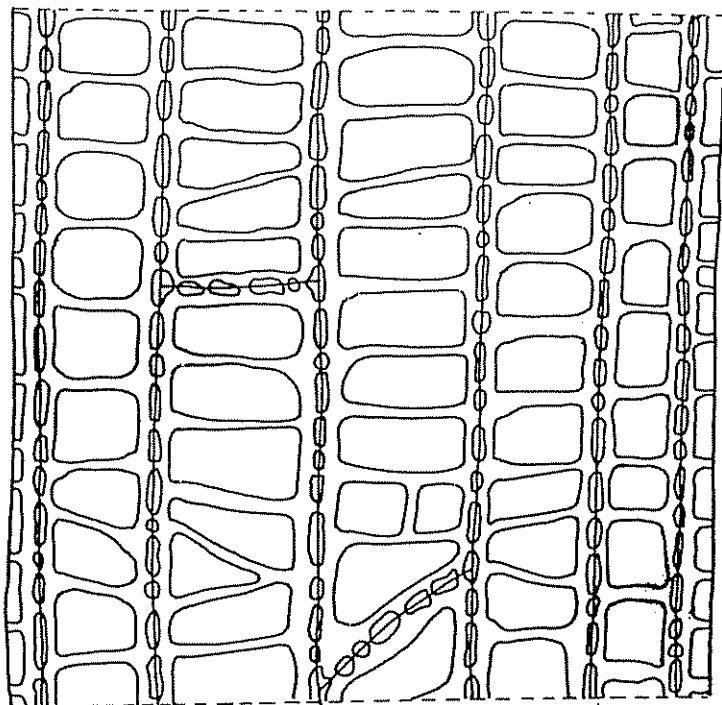


Figura 39. Vista lateral de un segmento de una tráquea de una raíz adulta. Se aprecian los engrosamientos de la tráquea y de las paredes perpendiculares con los poros de las células que la rodean. Para mayor comprensión se han eliminado todas las demás paredes de las células circundantes (cv. Valery).

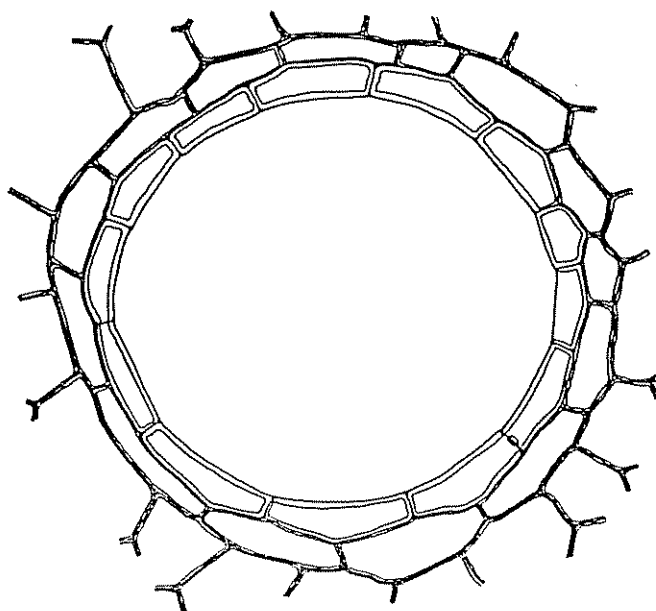
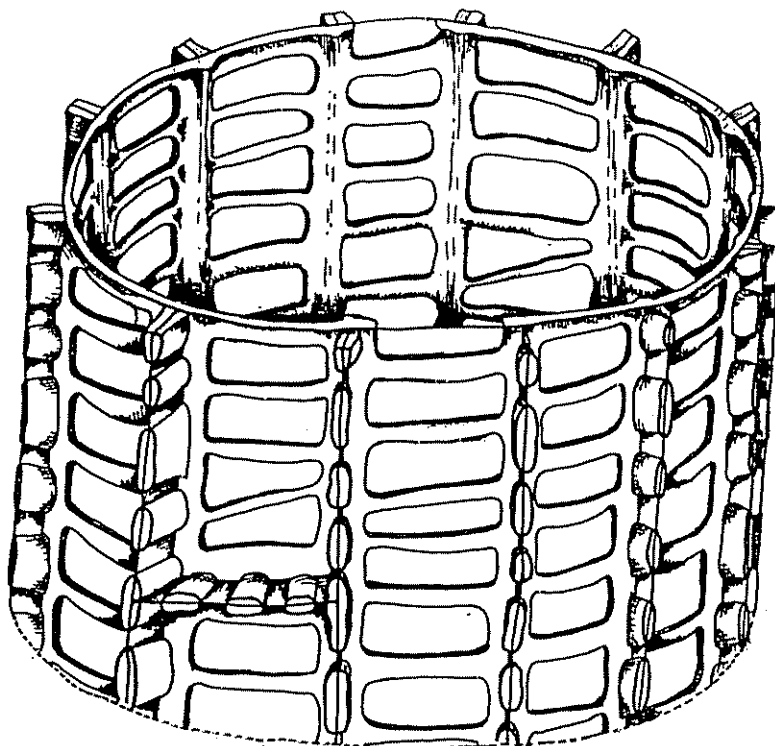


Figura 40. Corte transversal de una tráquea en una raíz madura que corresponde a la Figura 39.



/Figura 41. Aspecto tridimensional de un segmento de tráquea de una raíz adulta que corresponde a las Figuras 39 y 40. Se aprecian los engrosamientos de la tráquea y de las paredes perpendiculares de las células que la rodean. Para mayor comprensión se han eliminado las demás paredes de las células circundantes.

con muchas puntuaciones (Figs. 36, 39, 40, 41). En corte longitudinal estas puntuaciones se ven encima de la pared primaria (Fig. 36, 39). Las paredes terminales de estas células están igualmente perforadas con 3 a 6 puntuaciones. Rayos medulares atraviesan el cilindro vascular. Las raíces laterales se inician a partir del periciclo y se conectan con las partes del xilema y floema. Tienen una distribución poco uniforme a lo largo de las raíces principales. Sin embargo, Riopel (82) opinó que la iniciación de raíces laterales no puede ser un fenómeno al azar, a partir de cualquier posición en el protoxilema o en el periciclo. Este autor manifestó que en la distribución radical lateral debe existir un mecanismo de regulación más explicativo que condiciones especiales en los polos de protoxilema o balance de metabolitos a lo largo de la raíz principal.

La médula de la raíz madura posee paredes muy engrosadas y sin espacios intercelulares asemejando un esclerénquima; se observa poca lignificación (Fig. 37).

En corte transversal se notó que el floema consta de células pentagonales, pequeñas y con paredes delgadas. Cortes longitudinales permitieron visualizar que sus elementos cribosos son muy largos en comparación con otras plantas. El periciclo uniseriado es irregular en tamaño celular y sus células frecuentemente son un poco más pequeñas que las de la endodermis (Fig. 37).

En algunas raíces las paredes internas y radiales de la endodermis son fuertemente engrosadas (Fig. 37), en otras no

tanto. El tamaño de sus células es bastante regular. Cortes longitudinales evidenciaron que las células endodérmicas son muy alargadas. El engrosamiento endodérmico (Fig. 38), puede ser de varias capas de celulosa ligeramente lignificada y cutinizada; el engrosamiento se encuentra principalmente sobre la pared inferior. Este engrosamiento está atravesado por puntuaciones (Fig. 38) en todas las direcciones. El número y la distribución de células permeables (Fig. 37) es bastante variable de raíz en raíz.

La corteza radical posee unas 16 a 18 hileras de células radiales, isodiamétricas, muy poco engrosadas y con espacios intercelulares regulares relativamente grandes (Fig. 37). Luego siguen unas tres capas de parénquima no ordenado (irregular) con gránulos de almidón en algunas de sus células. Después son muy evidentes grandes espacios aeríferos. Estos espacios son lisígenos, con cierto aplastamiento de las paredes laterales de las células rodeantes; no hay evidencia de restos de un proceso rexígeno de formación. La condición lisígena de estos espacios aeríferos ha sido informada también para otras monocotiledóneas (83). Esta parte del parénquima cortical no posee espacios aeríferos y se compone de unos 15 estratos de células, con paredes delgadas, siendo las más externas un poco cutinizadas.

4.3.2. Morfología y anatomía del cormo

Cortes longitudinales del cormo mostraron claramente las regiones de la corteza y del cilindro central. La corteza es de coloración clara, cremosa y el cilindro central es más oscuro. La separación entre ambas zonas es bastante notoria, ya que existe una franja de haces vasculares con orientación principalmente longitudinal. Algunos autores se refieren a ésta zona como capa de Mangin (22, 96). La zona cortical es menos extensa que el cilindro central y contiene en recorrido irregular hacecillos conductores que entran en las raíces u hojas, conectando con el cilindro central. Esta orientación de los hacecillos concuerda con lo señalado por León (65) y Simmonds (91). La corteza tiende a disminuir en espesor en su parte superior, cerca del ápice. El cormo está formado básicamente por tejido parenquimatoso, con gran cantidad de almidón. En esta investigación se determinó que hay mayor cantidad de almidón en la corteza que en el cilindro central. Microscópicamente los gránulos de almidón son de diferente tamaño (Fig. 85, p. 149). La funcionalidad del cormo como órgano de reserva es bien conocida (22, 65, 91, 96, 97). Se notó también presencia de exudaciones en la superficie cortada (mucílago), lo mismo que la rápida oxidación de los fenoles y polifenoles en todo el tejido del cormo.

En 1927 Skutch (92) sugirió que estructuralmente el cormo de Musa es de naturaleza simpodial. Las yemas aparecen a cierta distancia del meristema central y luego

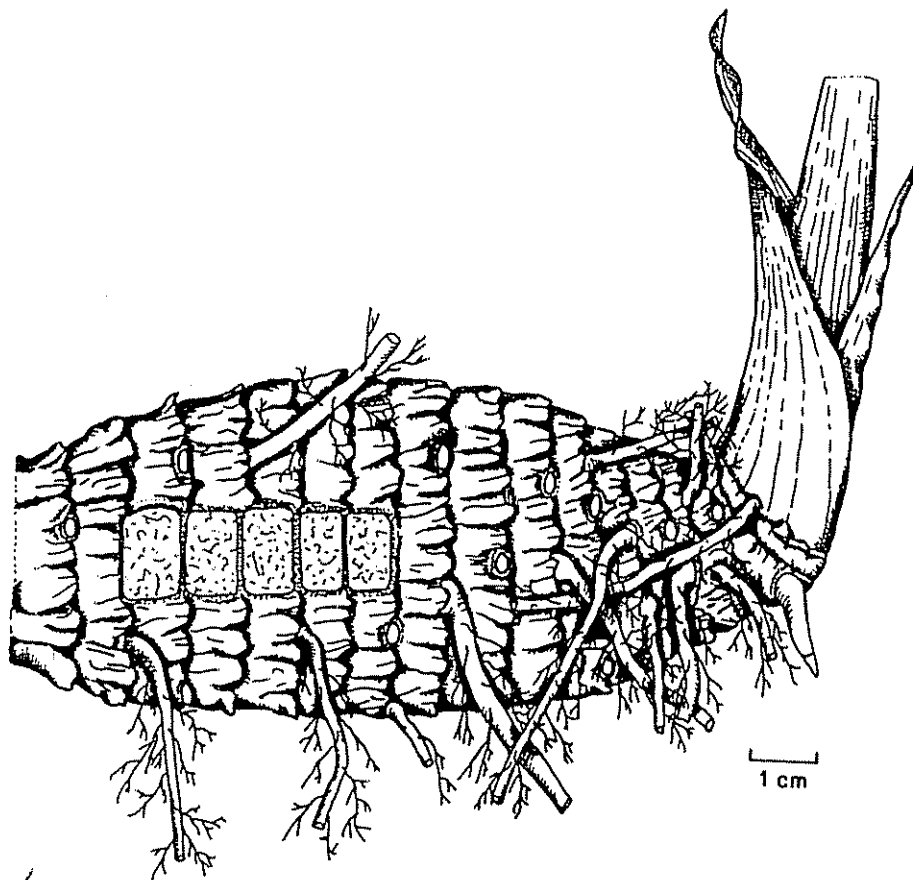


Figura 42. Cormo horizontal de un hijuelo de M. textilis. En la parte central se ha expuesto la estructura interna de la corteza mediante un corte superficial, mostrando la disposición de nudos y entrenudos. Parte de las raíces fueron eliminadas para una mayor comprensión.

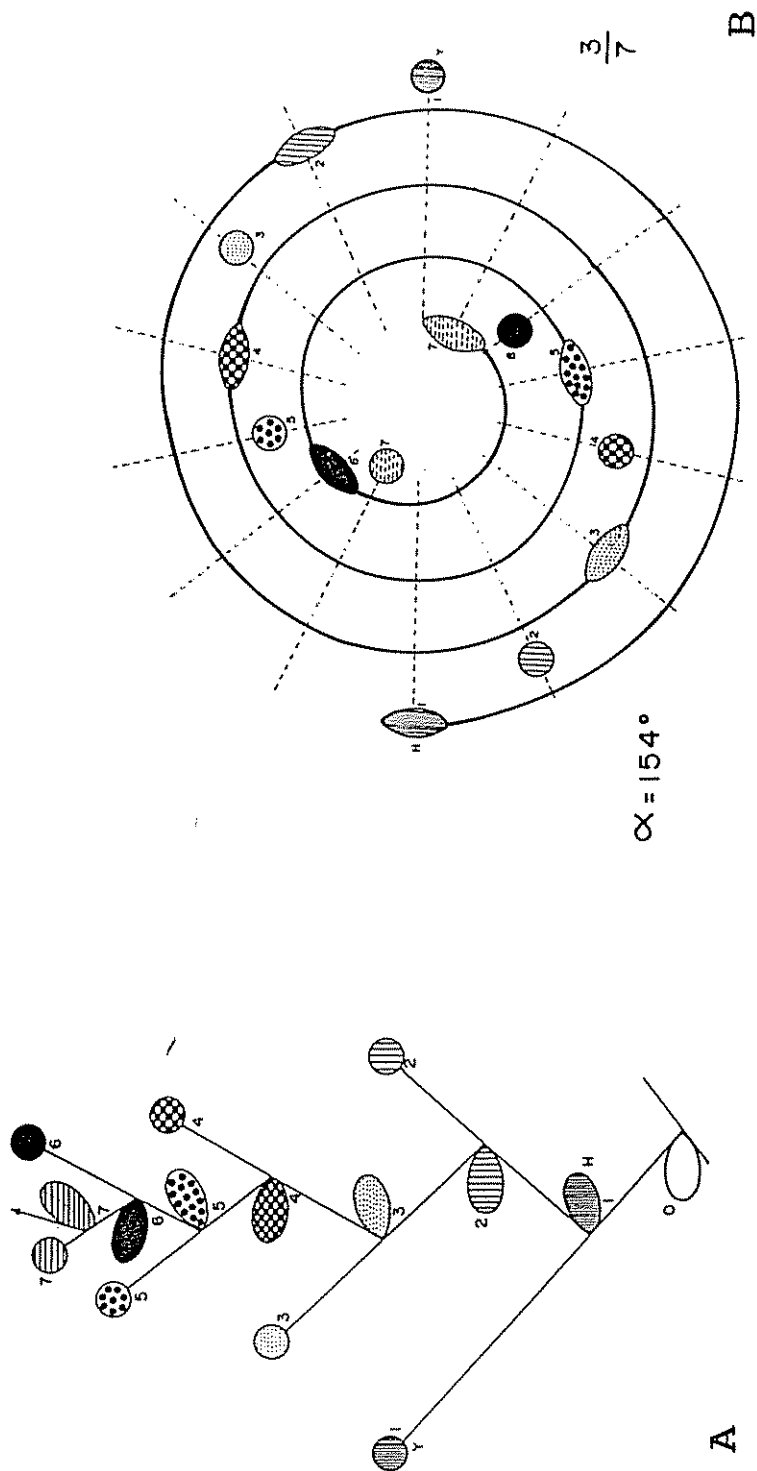


Figura 43. A) Esquema de un ripidio; Y yema correspondiente. 1 a 7 hojas y yemas correspondientes sucesivas.

B) Esquema de la disposición de las hojas y yemas en un corno de Musa. H hoja, Y yema correspondiente, 1 a 7 hojas y yemas correspondientes sucesivas. Como disposición foliar se asumió $\frac{3}{7}$ lo que da un ángulo de divergencia de 154° .

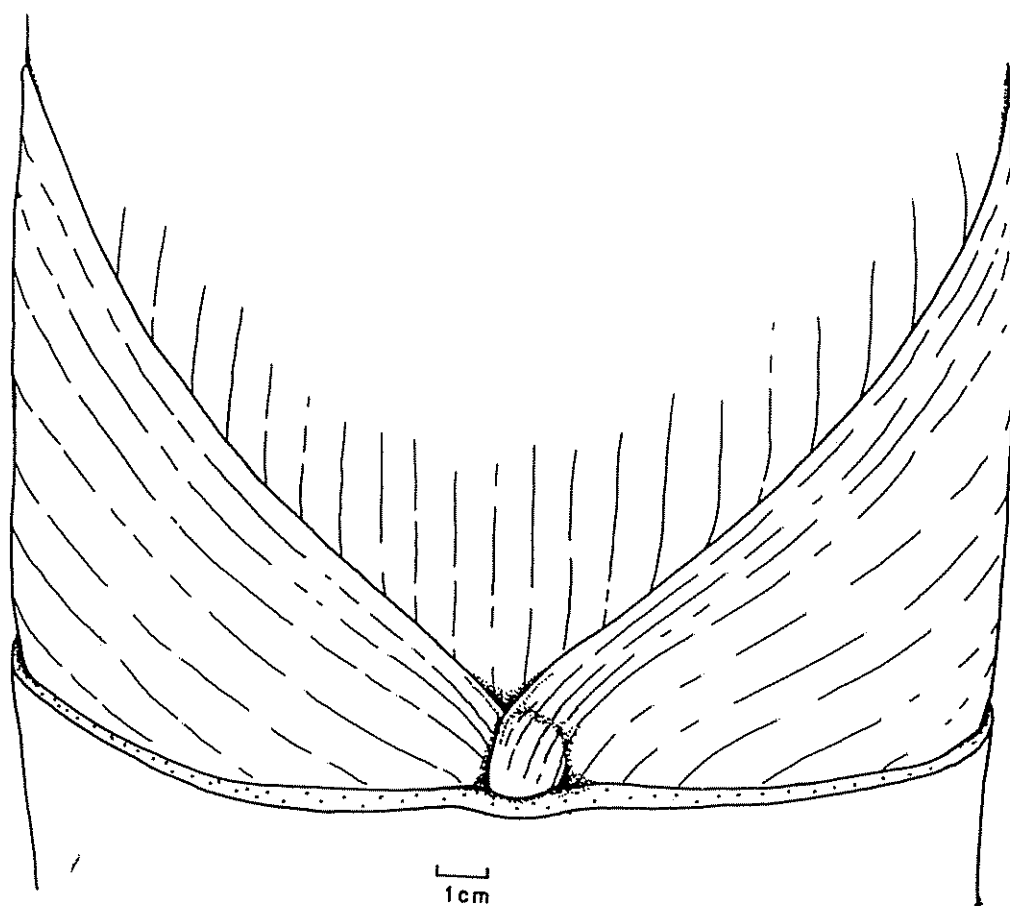


Figura 44. Vista de una yema lateral cubierta por los extremos superpuestos de la vaina circundante. La vaina debajo de la yema fue removida (cv. Felipita).

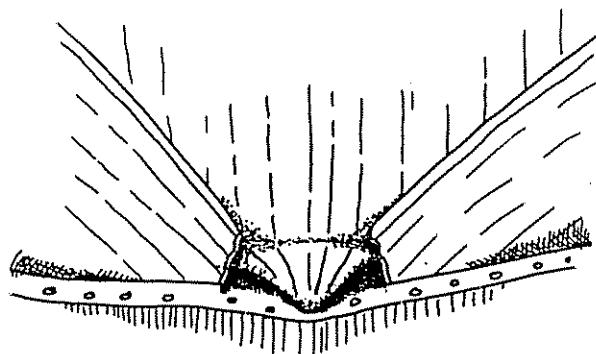


Figura 45. Vista de la misma yema lateral que en Figura 44 después de la remoción de los extremos superpuestos de la vaina circundante.

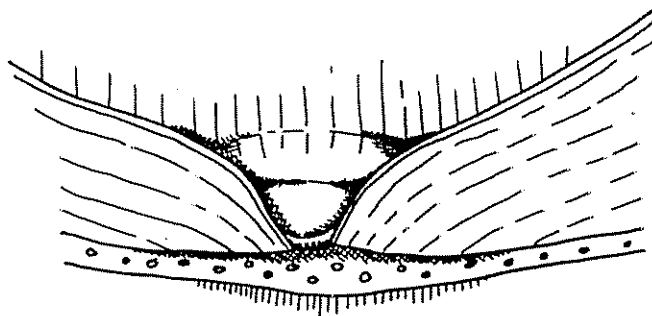


Figura 46. Vista de una yema lateral que no está cubierta por los extremos de la vaina. La vaina debajo de la yema fue removida y se aprecian los hacecillos vasculares cortados (cv. Pelipita).

aumentan gradualmente de tamaño al ser empujados hacia abajo en la zona cortical. Sin embargo, este autor no mostró evidencia morfológica-anatómica y sus observaciones no apoyaron esta interpretación. En 1961 De Langhe (32) indicó que el cormo de Musa es el tallo principal que emite ramificaciones laterales y que por tanto es de estructura monopodial. En 1962 Barker y Steward (7, 8) manifestaron que en Musa existe un eje dominante y que los brotes se originan a cierta distancia del meristema apical. En consecuencia, estos autores señalaron que morfológicamente el cormo es monopodial.

Los resultados de esta investigación sugieren que el crecimiento del cormo es simpodial. Las yemas que dan origen a los brotes o hijuelos se derivan de las laterales por desarrollo simpodial. Es posible observar entrenudos hasta de 10 mm en el eje de conexión entre la planta madre y el hijuelo (Fig. 42). El crecimiento del cormo es típicamente simpodial. La yema terminal siempre se inclina de lado, quedando finalmente en el lugar opuesto a la "hoja tectriz" (vainas) del complejo caulinar siguiente (Fig. 43, B). La "yema axilar" continúa su desarrollo, ubicándose luego en posición horizontal, con una divergencia típica de las musáceas, o sea, en posición filotáctica de 3/7 con 150° de divergencia ó 4/9 con un ángulo de 145°. Este crecimiento simpodial puede compararse con el de una inflorescencia cimosa, unipara helicoidal, es decir, un ripidio (Fig. 43 A), con la diferencia de que hay divergencia entre los ejes sucesivos. De esta manera es factible explicar la ausencia

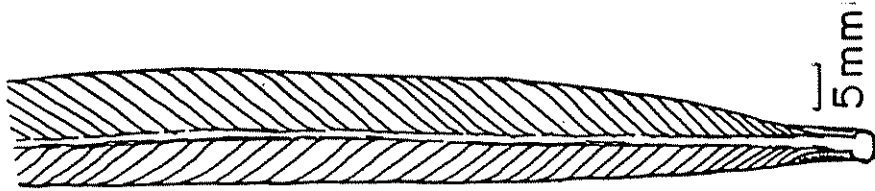


Figura 47. Parte basal de una hoja de espada muy joven (12 mm ancho) con su nervación típica y la asimetría de los semilimbos (cv. Gros Michel).

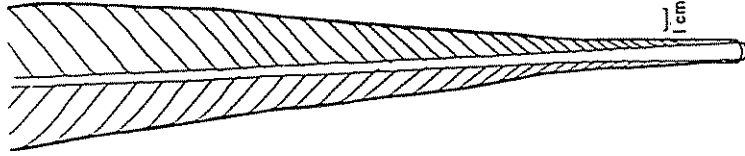


Figura 48. Parte basal de una hoja de espada joven con su nervación típica y asimetría de los semilimbos (cv. Gros Michel).

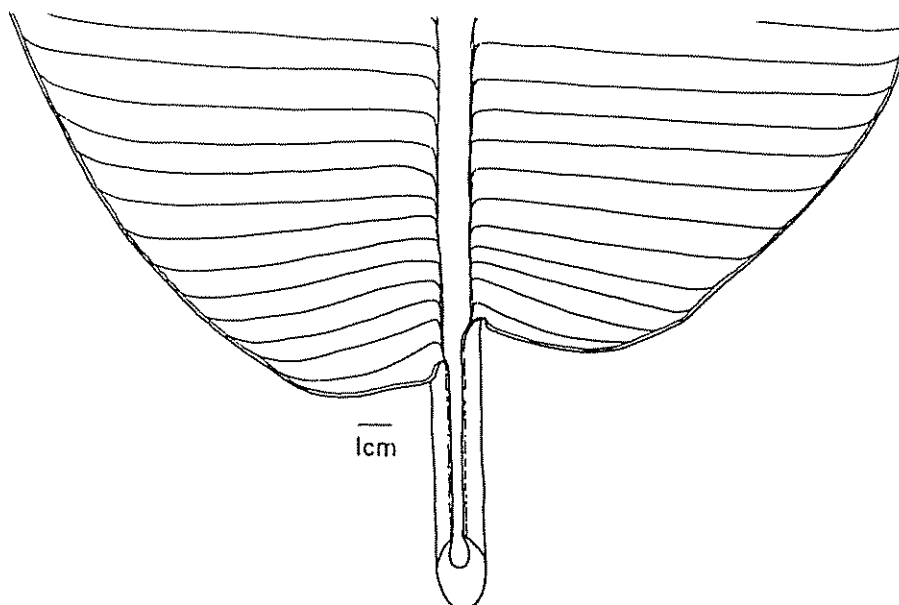


Figura 49. Asimetría basal de la hoja en Musa balbisiana.

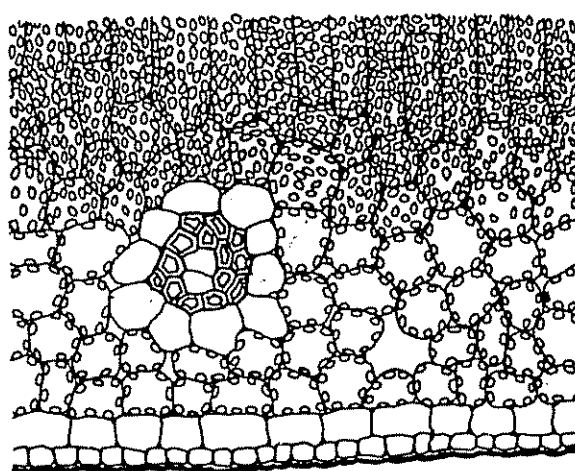


Figura 50. Corte transversal de una hoja de espada completamente desarrollada con lámina reducida (10 mm de ancho) a través de la región donde existe en una hoja normal la banda pulvinular (cv. Gros Michel).

de la yema "axilar" y la aparición a 180° de la yema lateral que puede estar, a veces, escondida entre los bordes basales laterales de la vaina correspondiente (Figs. 44, 45) o más frecuentemente expuesta (Fig. 46). Al iniciarse la transición al estado reproductivo cambia el sistema de crecimiento y el tallo continúa en forma monopodial, como lo indica claramente la posición axilar de las inflorescencias parciales. Sin embargo, el eje continúa siempre con un meristema o sea en forma vegetativa. La posición terminal de una flor en el caso del cv. Falso Cuerno (AAB) es apenas aparente. Se puede comprobar que en realidad es una flor axilar por la existencia de una bráctea diminuta. Sin embargo, debido a que en este caso el meristema apical no sigue desarrollándose como en otros tipos de Musa, la inflorescencia masculina (chira) tiende a atrofiarse rápidamente, desintegrándose en algunos casos. Esta interpretación concuerda con lo señalado por Skutch (92) y está en desacuerdo con lo mencionado por De Langhe (32) y por Baker y Steward (7, 8) y también con Cronauer y Krikorian (18) quienes dividen las inflorescencias en indeterminadas (bananos) y determinadas (cv. Falso Cuerno).

Baker y Steward (7, 8) manifestaron que los hijuelos del cv. Gros Michel tienen un origen adventicio por formarse a cierta distancia del ápice. En contraste, Fischer (42) indicó que debido a la posición inusual de las yemas que están en posición opuesta con relación a la axila foliar, los hijuelos laterales no son adventicios y tienden más a ser una formación axilar. En esta investigación se encontró

que realmente no son adventicios como es el caso in vitro, sino representan la brotación de la yema lateral (terminal), la cual, sin embargo, no puede clasificarse como "axilar" debido a su posición.

4.3.3.. Morfología y anatomía de hojas y vaina

En hijuelos las primeras hojas (hojas de espada) son lanceoladas, muy angostas y de base asimétrica (Figs. 47, 48), con abundante contenido de latex que brota al cortar la lámina. Si esta hoja es muy joven (25 cm de largo y 10 mm de ancho) todavía no posee un peciolo diferenciado, sino que la inserción se traslapa con la vaina. A la altura de la nervadura central no se observa todavía la banda pulvínular (Figs. 50, 51). Tampoco hay en esta hoja una estructura de hoja adulta, sino que aparenta una hoja típica con un mesofilo diferenciado en una capa de parénquima empalizada, seguido por un parénquima esponjoso con espacios intercelulares grandes, pero sin indicación de una estructura compartimentalizada (Figs. 50, 51). La hipodermis inferior generalmente es uniseriada. Los haces vasculares no se extienden completamente de epidermis superior a la inferior (Fig. 50). Ocasionalmente existe un esclerénquima en la parte superior de algunos haces vasculares. Hay presencia de rafidios y cristales individuales. En el lado superior e inferior de esta hoja las células epidermales son muy cortas y regulares (Fig. 50).

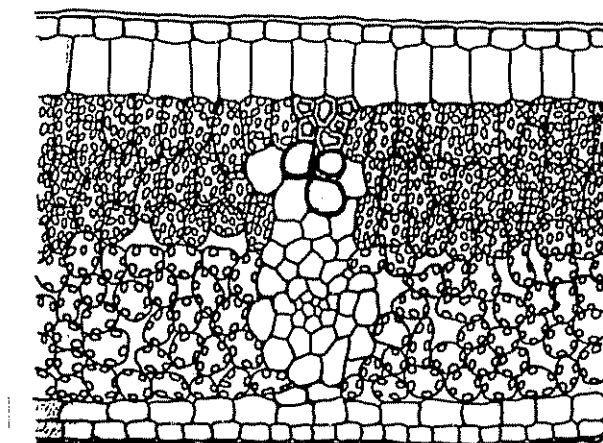


Figura 51. Corte transversal de una hoja de espada con lámina muy reducida (20 mm ancho).

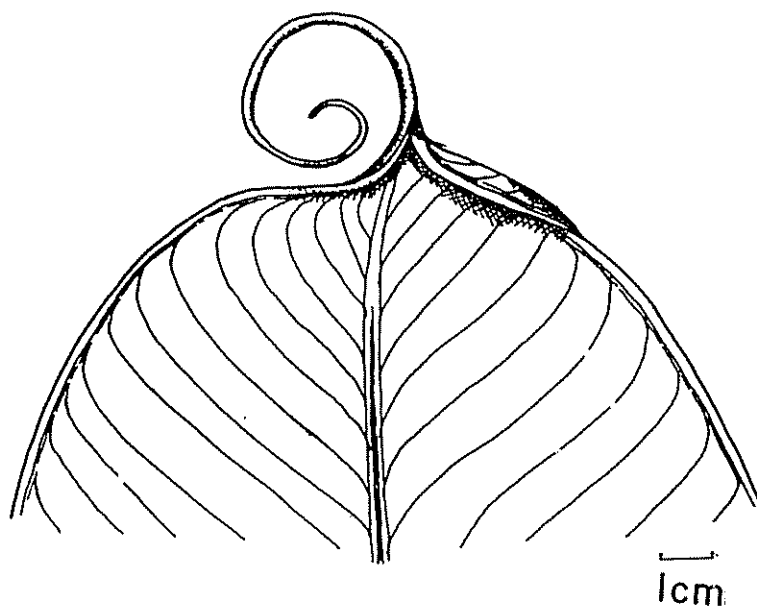


Figura 52. Hoja adulta antes de desenrollarse completamente con el ápice todavía intacto.

En cortes transversales de hojas espada de 50 cm largo y 20 mm de ancho se pudo observar que existen haces vasculares rodeados por esclerénquima típico, sin embargo, la estructura todavía es semejante a la de una hoja de espada más pequeña (Fig. 51). El parénquima en empalizada está diferenciado. Los cristales son en su mayoría prismáticos. También fueron evidentes cristales alargados y cortos (Fig. 78, p. 145). En la nervadura central se nota un estado más avanzado, todavía transicional, hacia un parénquima estrellado.

En hojas de tamaño mayor a los 50 cm de largo y 5 cm de ancho el esclerénquima que rodea a los hacecillos conductores se extiende de hipodermis superior a la inferior. La epidermis e hipodermis superior conforman en conjunto tres estratos celulares. Es evidente un parénquima estrellado en la vena central. El parénquima en empalizada está formado de tres estratos de células alargadas en sentido transversal.

En esta edad la vaina es la parte más extensa, el peciolo es muy reducido y la lámina foliar de superficie angosta a ambos lados de la vena central. Las hojas siguientes continúan su desarrollo asemejándose más y más a las adultas.

Las hojas adultas presentan cuatro partes bien diferenciadas: vaina, peciolo, lámina y apéndice. La vaina es larga y envolvente, formando el pseudotallo. El peciolo es acanalado, semicilíndrico y puede fluctuar en tamaños

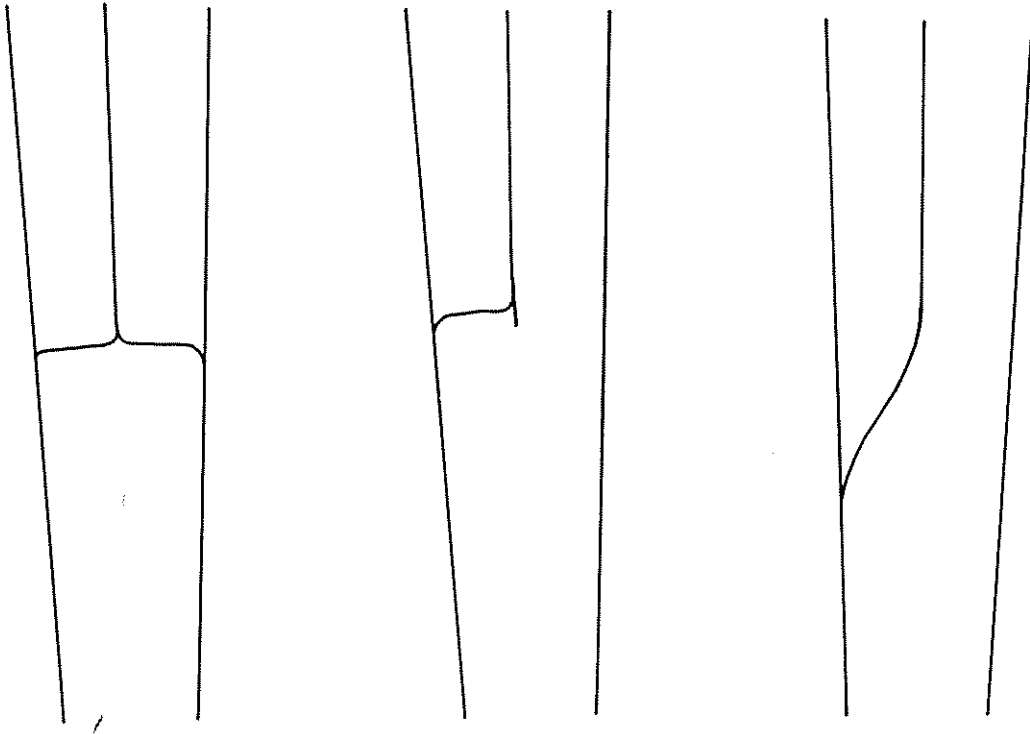


Figura 53. Dibujo esquemático de las posibilidades de reducción (o aumento) del número de venas secundarias.

desde los 25 hasta los 45 cm. La lámina representa una considerable superficie fotosintética que puede llegar a alcanzar en algunas variedades hasta más de dos metros de largo, por un metro de ancho. La lámina está dividida en dos semilimbos por una nervadura central. Esta nervadura es muy evidente y también lo son los nervios laterales principales (Figs. 49, 52). El color de la haz es verde oscuro y del envés verde claro, en gran parte debido a la presencia de abundante cera epicuticular (Fig. 73, p. 141). La vena central es semicircular, convexa, por la cara abaxial y cóncava en la adaxial (Fig. 49). Generalmente el semilimbo derecho (observando la hoja por el envés) es en promedio 1 cm más ancho que el izquierdo. El ápice de la hoja es una prolongación filiforme de varios centímetros de largo (Fig. 52). Después de la emergencia de la hoja, el ápice se seca y tiende a sufrir abscisión. El grosor de la lámina varía dependiendo del cultivar, sin embargo su promedio se encuentra a 0,5 mm. En general, la forma de las hojas es ovalo-oblonga.

En la parte basal de la hoja las venas están dispuestas en ángulos de 100 a 110 grados. En la parte media la disposición es de 75 a 80 grados y cerca del ápice es de unos 30 grados. La disposición de la nervación secundaria es entonces diferente en partes diferentes de la hoja (Figs. 49, 52, 53).

A veces en el borde, algunas células presentan antocianos. En cultivares cuyo borde es rojizo, los estomas

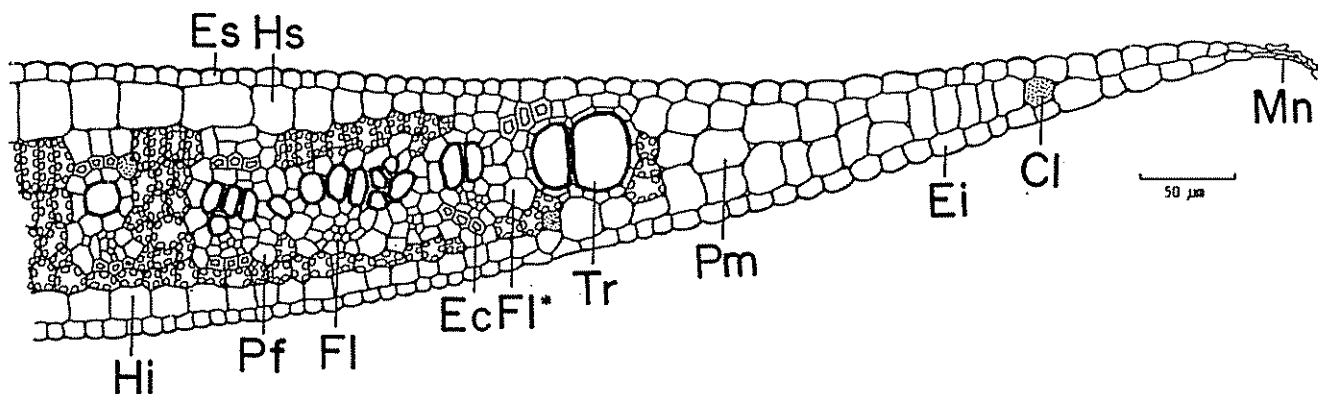


Figura 54. Borde foliar de una hoja adulta con el margen necrosado (cv. Pelipita).

- Cl Canal laticífero
- Ec Esclerénquima
- Ei Epidermis inferior
- Es Epidermis superior
- Fl Floema
- Fl* Floema del haz marginal
- Hi Hipodermis inferior
- Hs Hipodermis superior
- Mn Margen necrosado
- Pf Parénquima fascicular
- Pm Parénquima incoloro del mesofilo
- Tr Tráquea grande del haz marginal

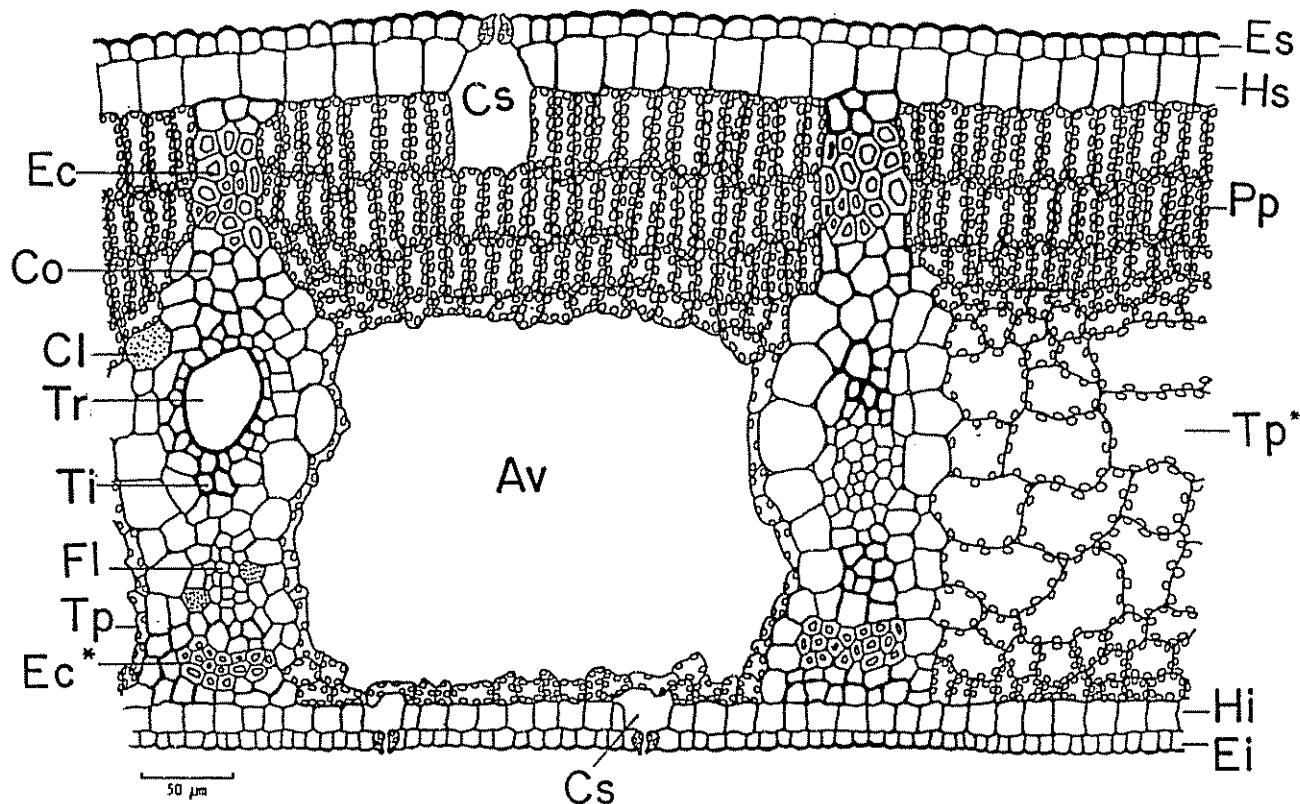


Figura 55. Corte transversal de una hoja adulta (nomófilo) (cv. Pelipita).

Av	Alvéolo
Cl	Canal laticífero
Co	Colénquima
Cs	Cavidad subestomática
Ec	Esclerénquima superior
Ec*	Esclerénquima inferior
Ei	Epidermis inferior
Es	Epidermis superior
Fl	Floema
Hi	Hipodermis inferior
Hs	Hipodermis superior
Pp	Parénquima en empalizada
Ti	Traqueida
Tp	Tapete de parénquima esponjoso
Tp*	Tapete de parénquima esponjoso contra tabique y visto de frente
Tr	Traquea

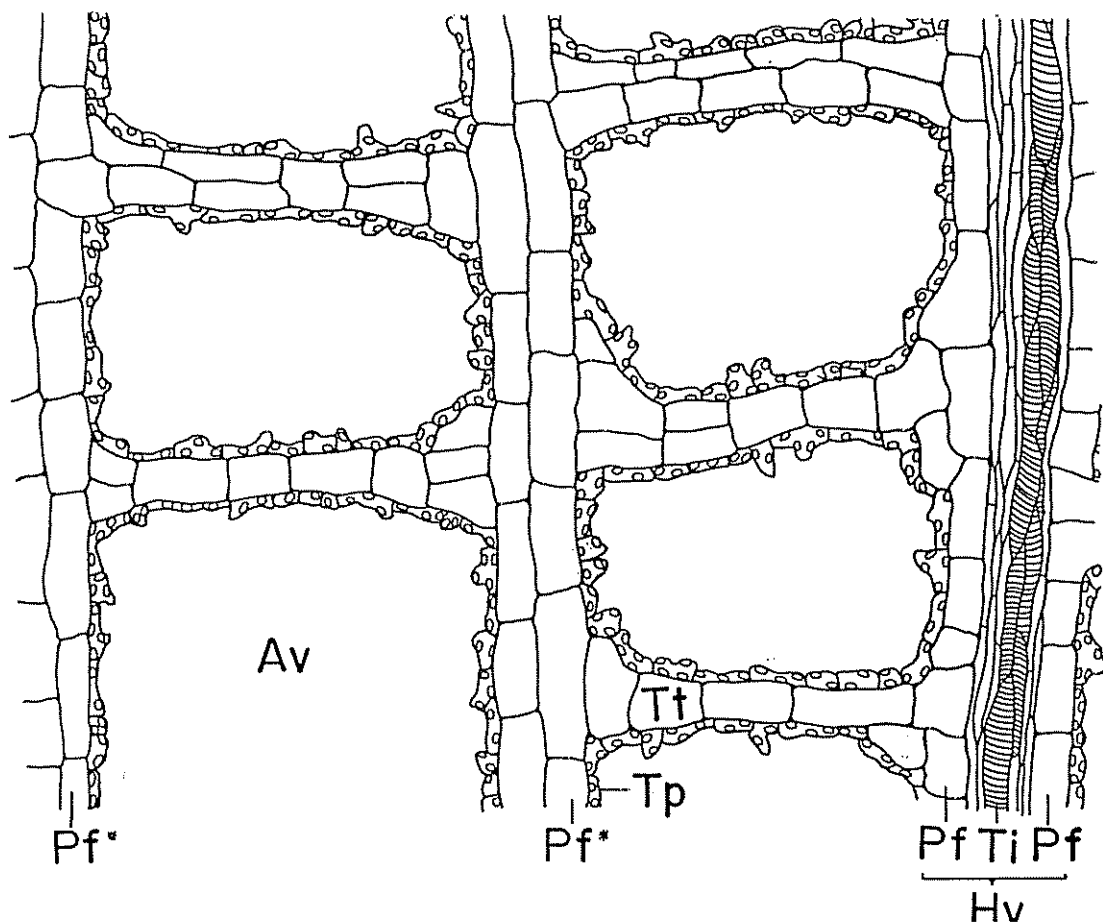


Figura 56. Corte paradermal cerca de la epidermis inferior de una hoja adulta con compartimentalización debida a los tabiques separatorios (cv. Gran Enano).

- Av Alvéolo
- Hv Hacecillo vascular
- Pf Farénquima fascicular
- Pf* Parénquima fascicular del tabique longitudinal con los elementos conductores a diferente altura
- Ti Traqueida
- Tp Tapete de parénquima esponjoso
- Tt Tabique transversal

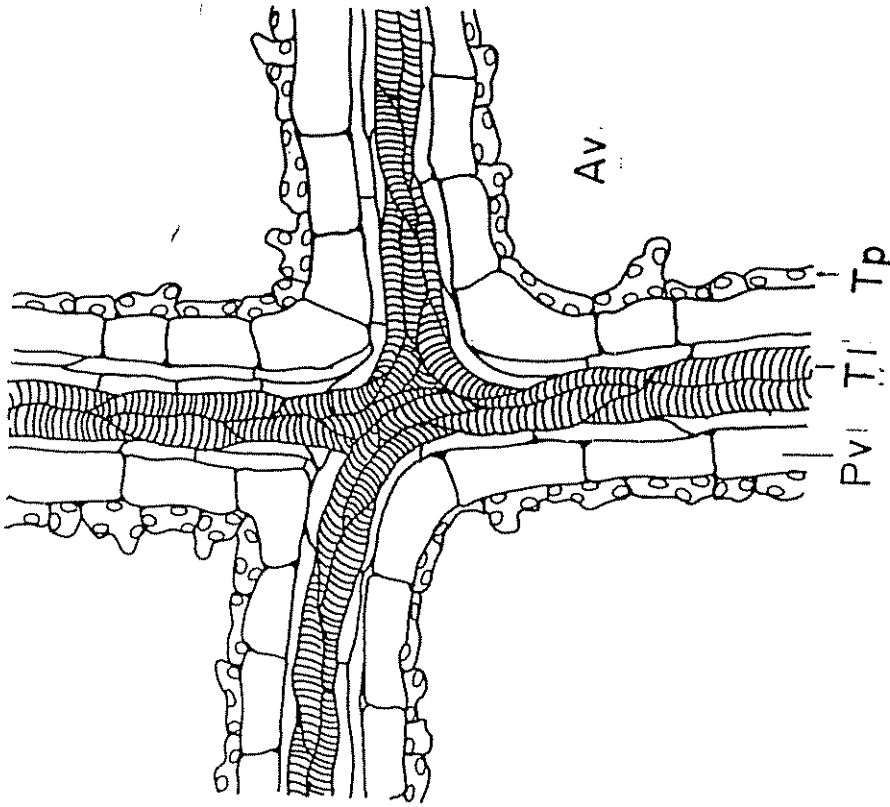


Figura 57. Corte paradermal de la misma hoja que en Figura 56 a la altura de los haces vasculares en los tabiques (interconexión xilemática).

- Av Alvéolo
- FV Parénquima vascular
- TP Tapete de parénquima esponjoso
- Ti Traqueidas

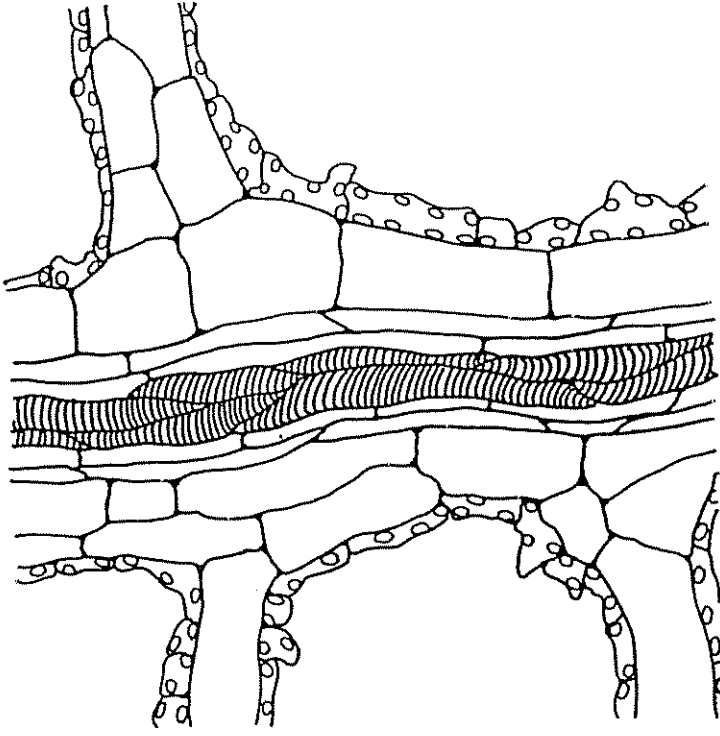


Figura 58. Corte paradermal de la misma hoja que en Figura 56 debajo de los haces vasculares en los tabiques transversales.

no presentan este pigmento en sus células guarda y anexas. Conforme se avanza hacia el interior de la lámina muy pocas células presentan antocianos. En las hojas más maduras la parte externa del borde se necrosa y puede desintegrarse parcialmente. Cuando esto sucede es evidente cierta cutinización. En este borde ocurren anastomosis de las venas principales laterales con la vena marginal. El borde es un poco irregular y presenta unas 10 a 12 hileras de células sin cloroplastos. Ocasionalmente las células de la hilera interna del borde poseen pocos cloroplastos.

Los haces vasculares están rodeados de esclerénquima que a veces puede alcanzar hasta las células de la epidermis superior; generalmente consta de 8 a 12 células, pero en venas más fuertes puede alcanzar 35 o más células. Similarmente el esclerénquima en la parte inferior también puede hacer contacto directo con la hipodermis. En el caso de haces vasculares terciarios varias células colenquimatosas se localizan entre el xilema y la hipodermis sobre las células del esclerénquima. En la cara abaxial a veces el esclerénquima limita con la hipodermis en forma directa, pero con mayor frecuencia una o dos capas de clorénquima están situados entre el esclerénquima y la hipodermis inferior. El esclerénquima en el lado abaxial consta de unas 15 células, siendo mayor (aproximadamente unas 20 células) en las venas más fuertes; con células de lumen muy pequeño. Los elementos del floema son muy pequeños. No hay engrosamientos fuertes de las paredes en la parte central del haz conductor, sino existen

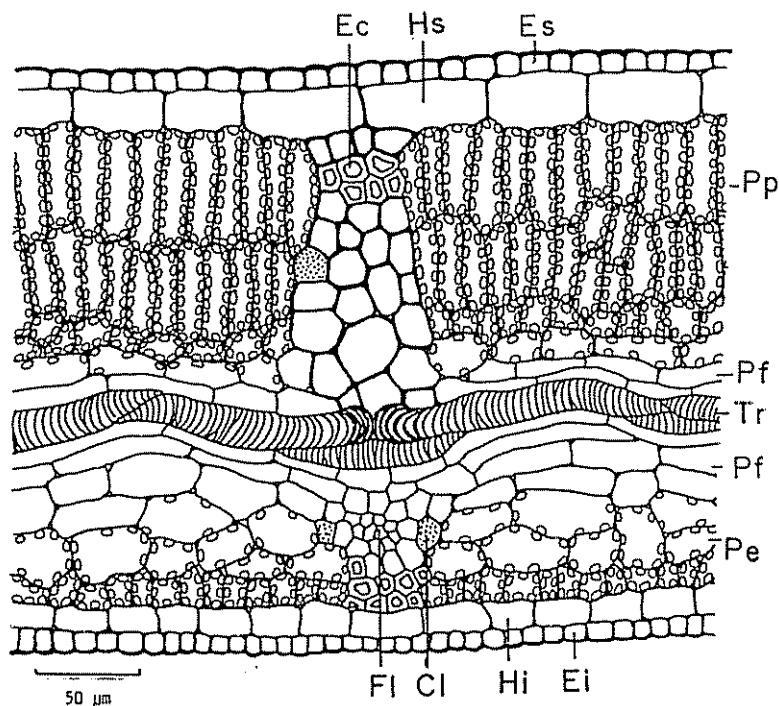


Figura 59. Corte transversal de una hoja adulta a la altura de un tabique longitudinal. La parte xilemática del hacesillo vascular del tabique transversal está conectada por traqueidas con el hacesillo vascular del tabique (cv. Gran Enano).

Cl	Canal laticífero
Ec	Esclerénquima
Ei	Epidermis inferior
Es	Epidermis superior
F1	Floema
Hi	Hipodermis inferior
Hs	Hipodermis superior
Pe	Parénquima esponjoso
Pf	Parénquima fascicular
Pp	Parénquima en empalizada
Tr	Traqueidas laterales

células de pared un poco más gruesas tipo (colénquima) entre el xilema y el floema. En el centro del xilema hay frecuentemente vasos grandes (tráqueas) y varias traqueidas (Figs. 54, 55). Las células grandes laterales a los elementos conductores (acompañantes) no poseen cloroplastos y representan la vaina fascicular. Es notorio también, que a veces el xilema presenta vasos muy pequeños. Es evidente la organización compartimentalizada del nomófilo (Figs. 55, 56, 57, 58).

A la altura de la nervadura central, en el lado inferior, el esclerénquima está fuertemente lignificado, pero en el lado superior la lignificación es leve, especialmente en la periferia de los haces vasculares. En cortes a la altura de la nervadura central fueron evidentes excreciones de latex.

Se observó que los ductos de latex o laticíferos están en asocio con los hacecillos vasculares (Figs. 55, 59). Los laticíferos en Musa secretan subproductos del metabolismo y son articulados, simples (sin ramificación, ni anastomosis) (39). El latex se encuentra en los peciolos, las vainas envolventes del pseudotallo y en las hojas. En los ductos laticíferos, el látex se encuentra a presión, por tal razón, cuando se corta uno o varios ductos, su contenido es extruido (70). En esta investigación, cuando se cortaron órganos que contenían látex, éste era exudado gradualmente hasta que su flujo cesó por taponeamiento debido a la coagulación. No obstante, hay quienes consideran que el

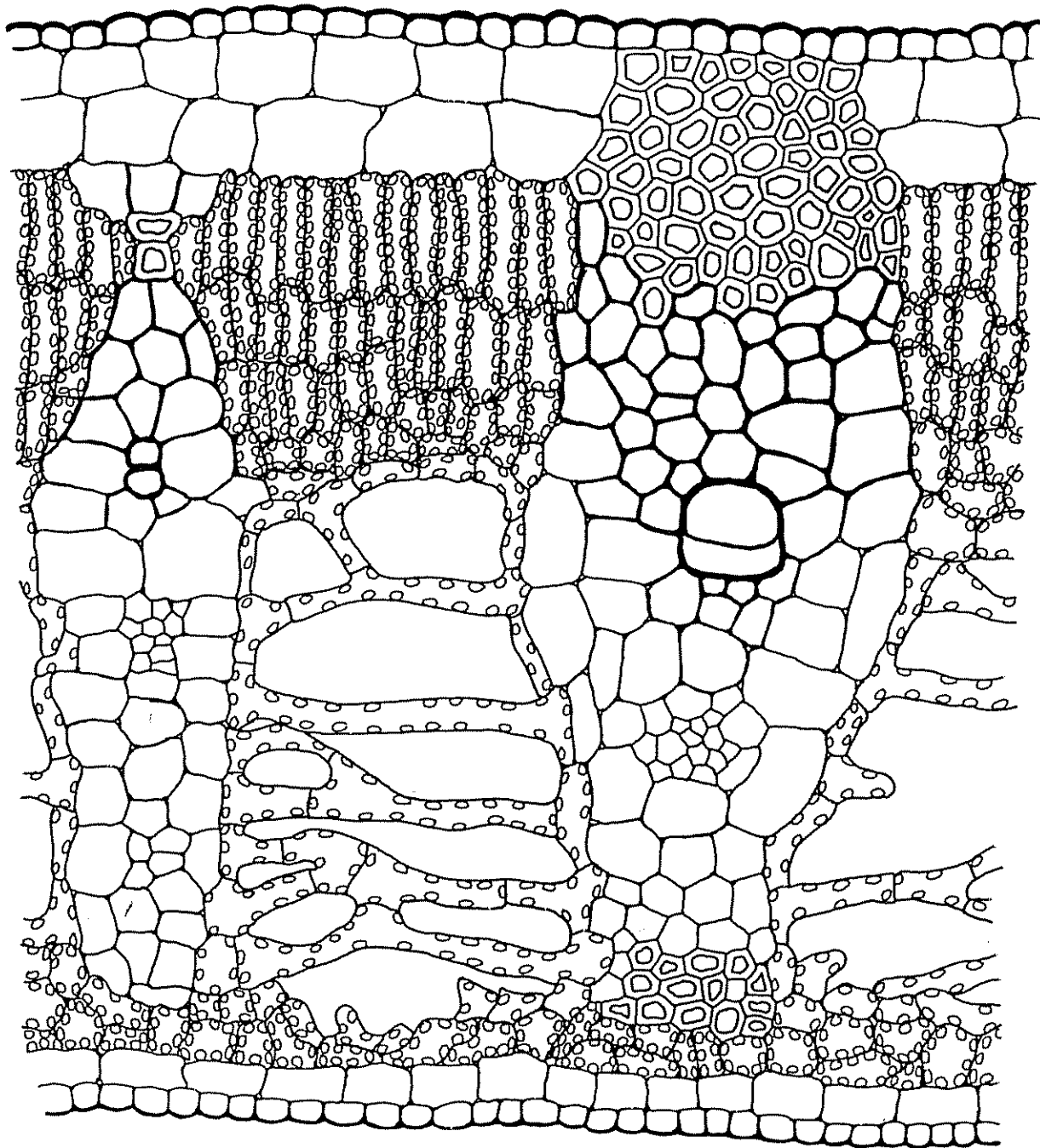


Figura 60. Corte transversal de una hoja adulta con células del parénquima esponjoso atravesando los alvéolos (cv. Gros Michel).

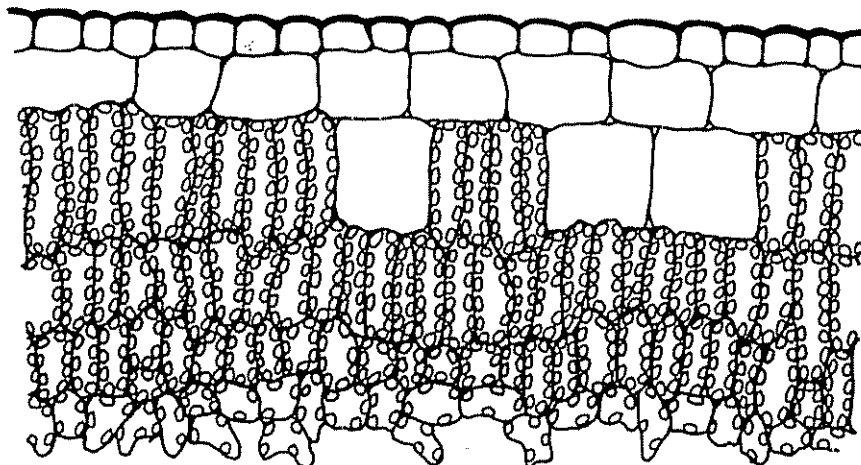


Figura 61. Corte transversal de la parte superior de una hoja adulta con hipodermis irregular (cv. Pelipita).

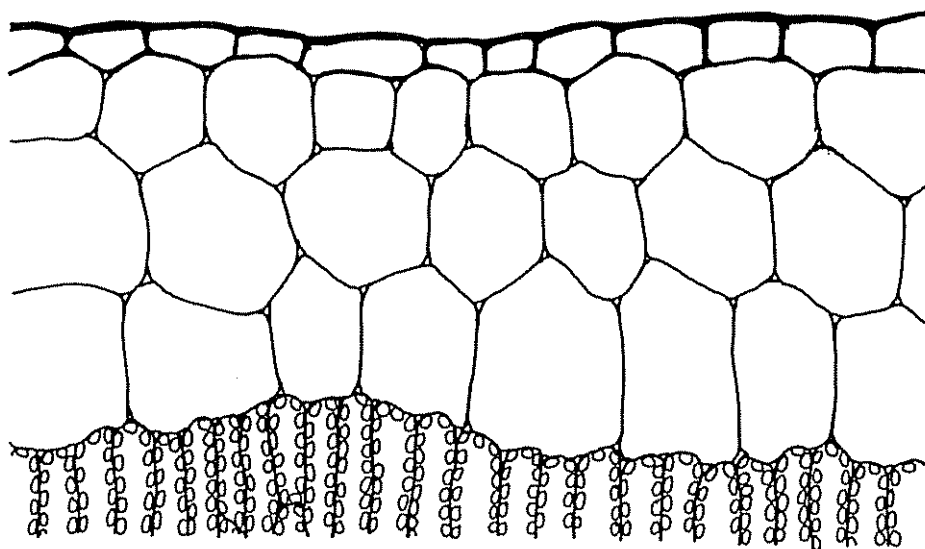


Figura 62. Corte transversal de la parte superior de una hoja adulta con hipodermis superior múltiple (cv. Pelipita).

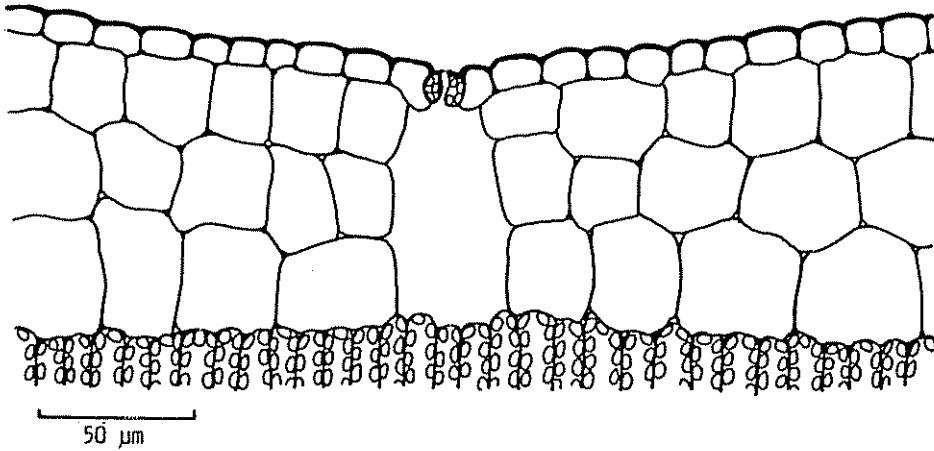


Figura 63. Epidermis superior con tres estratos de hipodermis en una hoja adulta (cv. Gran Enano).

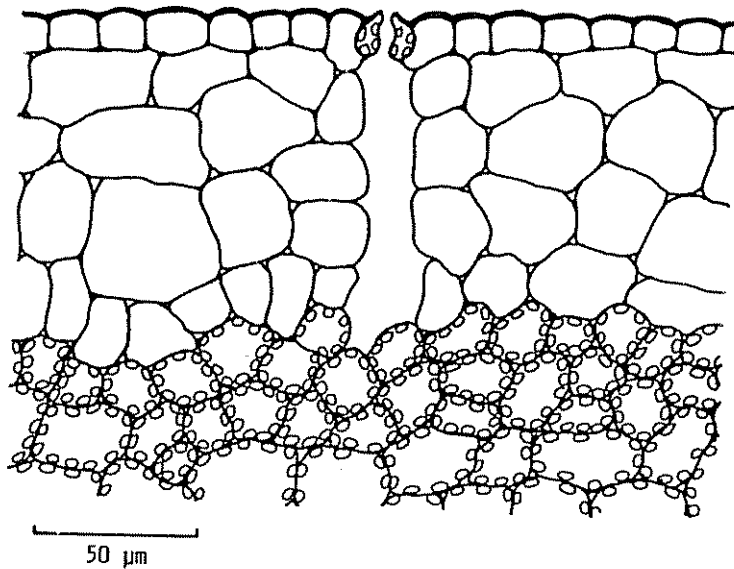
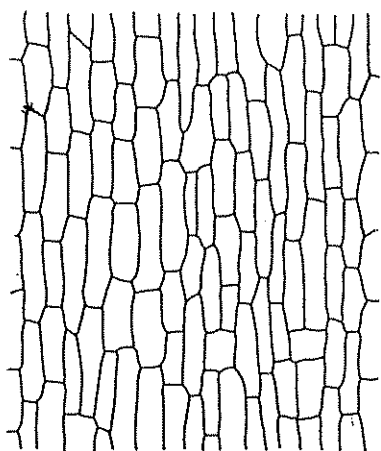
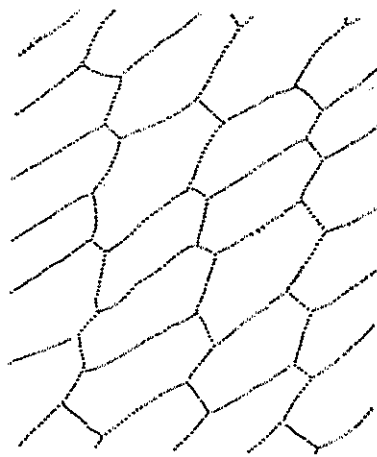


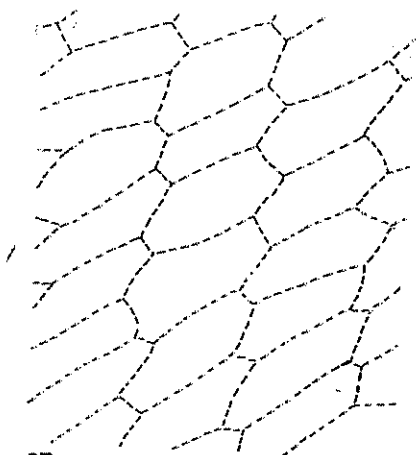
Figura 64. Corte transversal del lado abaxial de una hoja con la cavidad subestomática extendiéndose hasta el parénquima asimilador (cv. Pelipita).



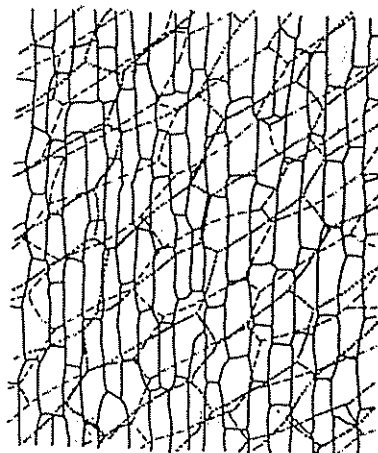
65



66



67



68

Figuras 65-66-67-68. Esquema de la orientación de las células de la epidermis superior (65), primero (66) y segundo estrato (67) de la hipodermis de una hoja adulta. Superposición de los tres estratos (68) (cv. Felipita).

cese en el flujo no es debido a coagulación del látex, sino que es una consecuencia del equilibrio del potencial de solutos del látex con los tejidos vecinos (62). El látex presenta una coloración blanquecina o lechosa.

Preparaciones con látex fresco permitieron observar que morfológicamente los politerpenoides contenidos en él se presentan en forma de pequeñas esferas. Aparentemente el látex de Musa es rico en iones; especialmente K^+ , Mg^{++} , Cl^- y NO_3^- (62). Además, contiene un tipo de orgánulos llamados luteoides que son capaces de activar el transporte de iones a través de las membranas (62). En Musa este hecho tendría gran importancia en las relaciones osmóticas de la planta (62).

El látex fue observado en todas las partes de plantas in vitro e in vivo, con excepción de las raíces. La falta de látex en las raíces podría tener implicaciones negativas en el transporte activo de iones (95). Los laticíferos fueron observados cerca del xilema y floema.

/

La hipodermis adaxial es generalmente de dos capas de grosor (Fig. 60). Sin embargo, en algunos casos, está constituida por tres ó cuatro estratos de células, con arreglo a veces bastante irregular (Figs. 61, 62, 63, 64). La orientación de las células de la hipodermis, cuando ésta es múltiple, se observa en las Figuras 65, 66, 67, 68. En las caras abaxial y adaxial fue evidente un estrato de epidermis y contrario a lo descrito anteriormente, uno de hipodermis (Figs. 55, 59). Observaciones similares fueron

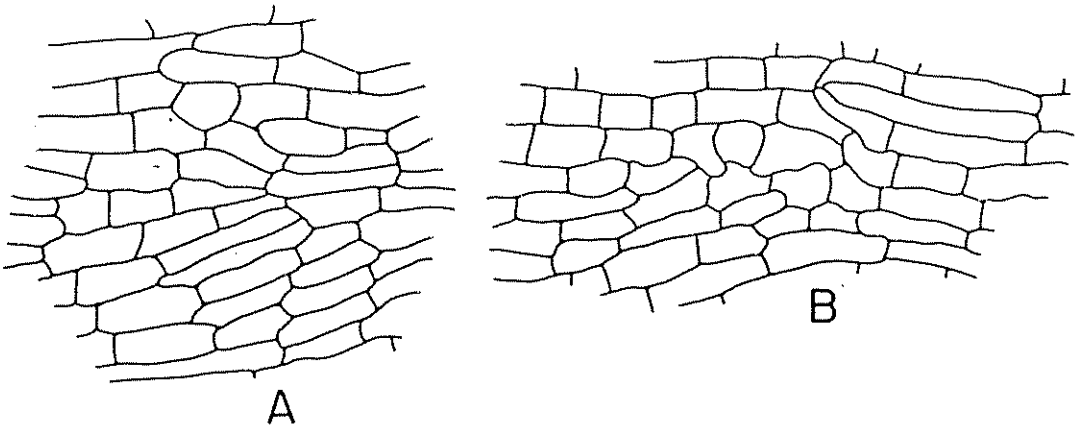


Figura 69. Epidermis superior (A) e inferior (B) del borde foliar de una hoja adulta, con arreglo irregular de las células epidérmicas debido a la reducción de la superficie foliar (cv. Gran Enano).

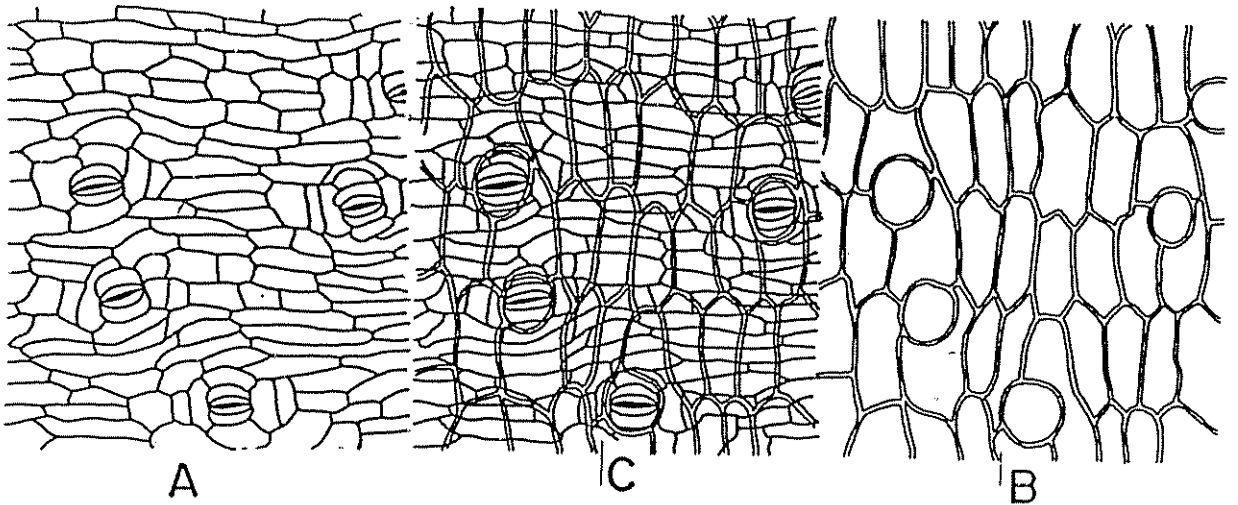


Figura 70. Esquema de la orientación de las células en la epidermis superior (A), hipodermis (B) y superposición de ambos estratos (C) de una hoja adulta (cv. Falso Cuerno).

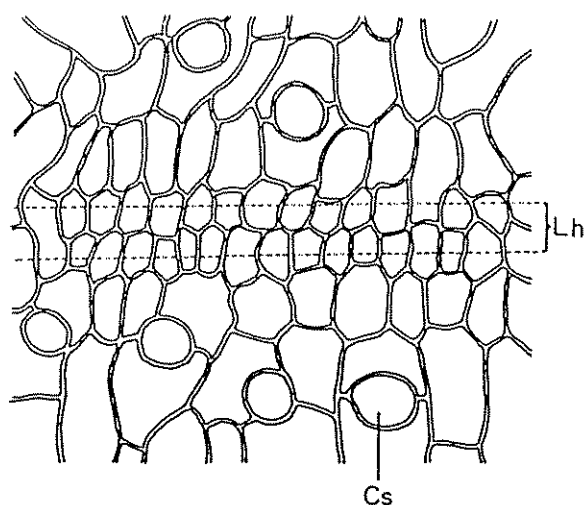


Figura 71. Hipodermis sobre una venación secundaria en una hoja adulta (cv. Gran Enano).

Cs Cavidad subestomática
Lh Límites laterales del haz
debajo de la hipodermis

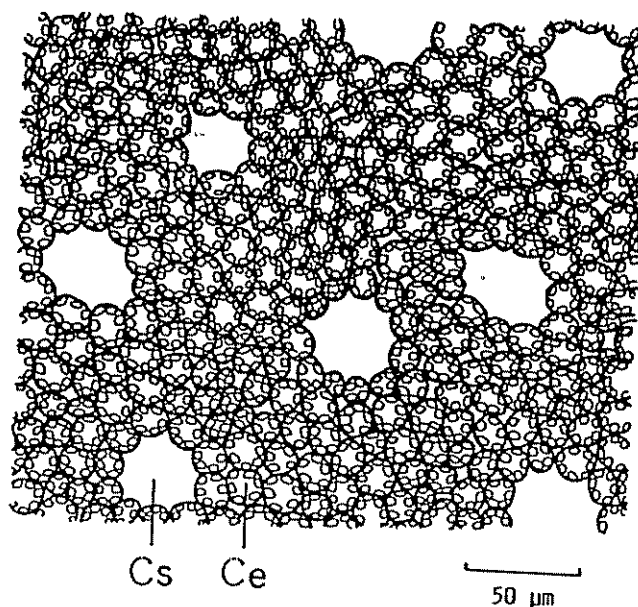


Figura 72. Corte paradermal a través del parénquima en empalizada en una hoja adulta cerca de la epidermis superior (cv. Falso Cuerno).

Ce Célula en empalizada
Cs Cavidad subestomática



Figura 73. Superficie foliar (lado abaxial) de una hoja adulta desarrollada en el campo con gran cantidad de cera epicuticular, especialmente en los límites entre las células (cv. Gran Enano).

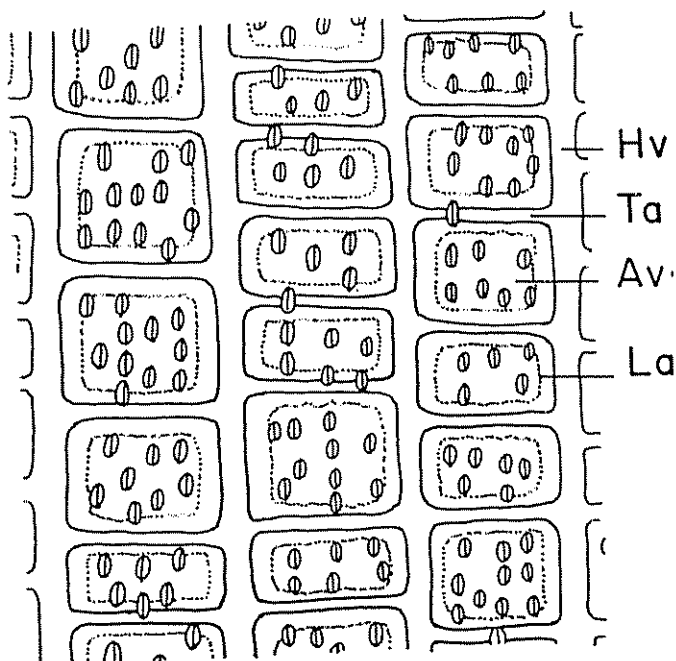


Figura 74. Esquema de la distribución de estomas en el lado inferior de una hoja adulta en relación a los alvéolos

Av	Alvéolo
Hv	Haz vascular
La	Límite del alvéolo
Ta	Tabique

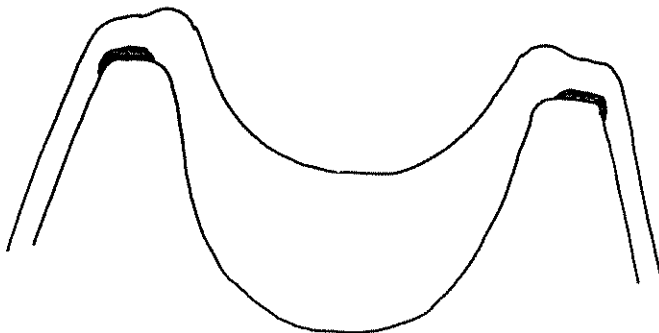


Figura 75. Esquema de un corte transversal de la nervadura central de un nomófilo, con indicación de la ubicación de la banda pulvinular (en negro). Los semilimbos están en posición plegada.

realizadas por Stover y Simmonds (97) y Aubert (3). Sin embargo, Soto (96) mencionó que en Musa balbisiana es frecuente la presencia de dos capas de hipodermis en el envés. A veces las células epidérmicas, especialmente en el borde foliar, pueden presentar un arreglo irregular (Fig. 69). La orientación de células epidermales en el lado adaxial se muestra en la Figura 70 y las de la hipodermis a la altura de una nervación secundarias en la Figura 71, donde se aprecia la reducción en el tamaño de las células hipodérmicas y, un arreglo más alineado de sus células.

La Figura 60 representa un corte realizado a través de una vena lateral principal. El esclerénquima está muy diferenciado, especialmente en el lado adaxial. Algunas células del parénquima esponjoso atraviesan los espacios aeríferos en varios sentidos. Se distinguen fácilmente tres estratos de parénquima en empalizada con células alargadas en sentido transversal. A la altura de la vena central, además de la epidermis, se observaron tres estratos de hipodermis. Cuando hay hipodermis multiestratificada, el segundo estrato tiende a presentar células un poco menos alineadas (Fig. 63), y los demás estratos son bastante irregulares (Fig. 64). La presencia de hipodermis múltiple reduce el número de estratos celulares de parénquima en empalizada generalmente a dos. En la Figura 72 se muestra como se observan las cavidades subestomáticas al realizar un corte paradermal del parénquima en empalizada cerca de la epidermis superior.

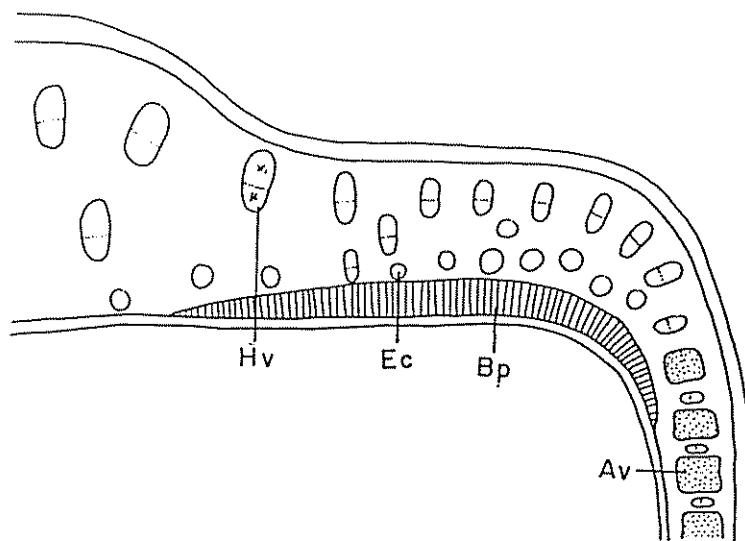


Figura 76. Esquema de un corte transversal a través de la región de la banda pulvinar.

- | | |
|----|----------------|
| Av | Alvéolo |
| Bp | Banda pulvinar |
| Ec | Esclerenquima |
| Hv | Haz vascular |

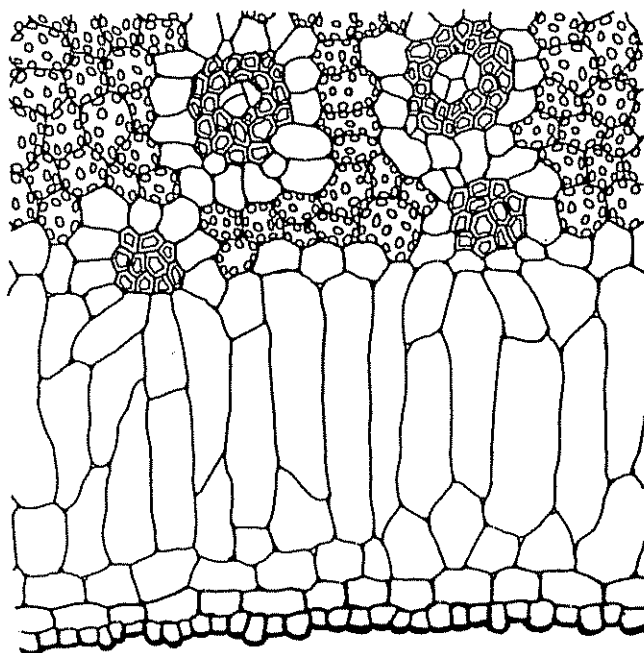


Figura 77. Corte transversal de una hoja normal (nomófilo) por la banda pulvinar (cv. Gran Enano).

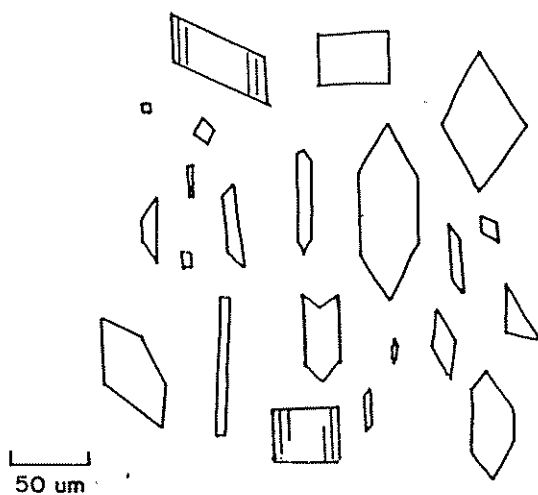


Figura 78. Variabilidad de la forma de los cristales encontrados en las células de diversos tejidos.

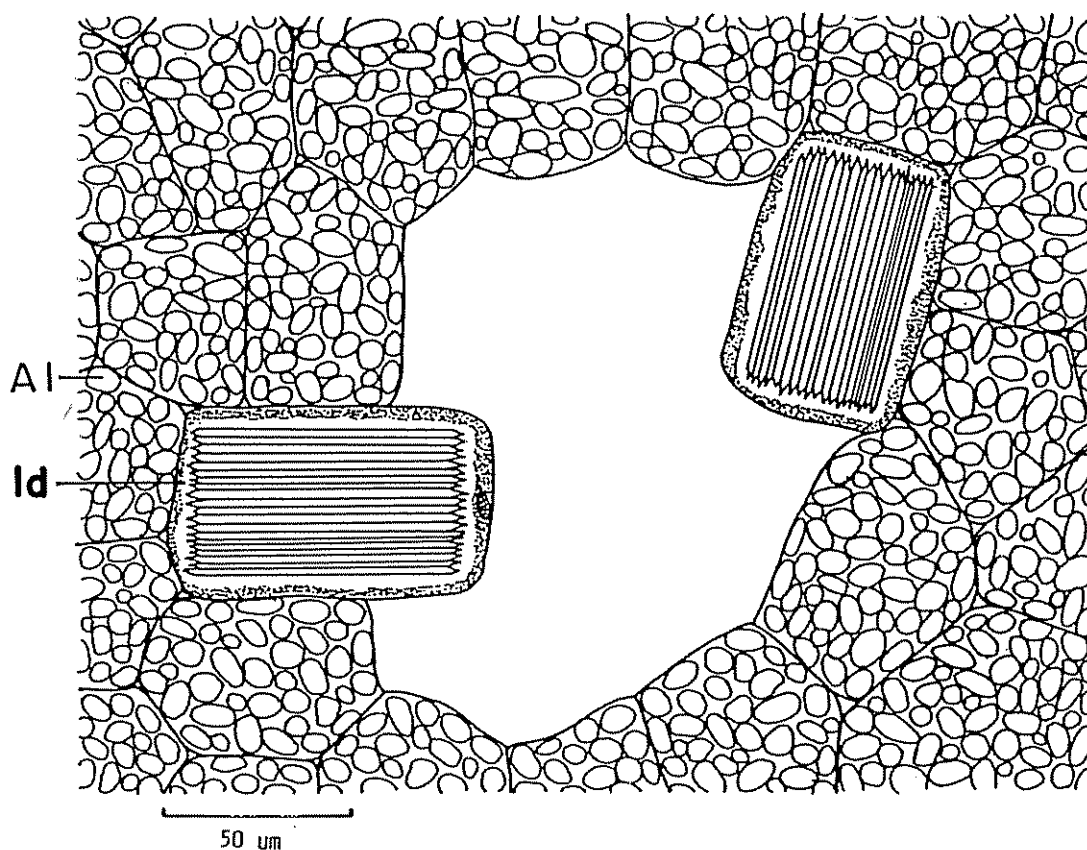


Figura 79. Idioblastos (Id) con rafidios incrustados en el parénquima amiláceo en una vaina de una planta adulta. Granos de almidón (Al)(cv. Falso Cuerno).

La cantidad de cera epicuticular es mayor que en hojas de plantas en aclimatación y es siempre más evidente en la superficie abaxial que en la adaxial. Es muy conspicua en los bordes de las células epidermales (Fig. 73). En el cv. Gran Enano hay mayor cantidad de estomas en la superficie abaxial que la adaxial y en una gran mayoría están abiertos (Fig. 73). Los estomas del cv. Gran Enano en el lado abaxial miden en promedio 27 micrómetros de largo y 17 de ancho. En los casos en que hay hipodermis múltiple y presencia de estomas, se extiende la cavidad subestomática a través de las células epi e hipodermiales hasta el mesofilo (Figs. 63, 64), pero no se continúa la cavidad en el parénquima empalizada como ocurre en hojas con hipodermis de dos estratos. La hoja presenta una estructura compartimentalizada. La Figura 74 muestra la distribución de estomas en el lado abaxial con relación a esta compartimentalización.

En el cv. Valery (AAA) se observaron estomas en la nervadura central. También fue evidente una hipodermis triestraficada. En el fondo y en la parte superior de la nervadura central se observaron muchos estomas rodeados de células pequeñas. La banda pulvínular fue muy evidente entre la nervadura central y la lámina (Figs. 75, 76, 77). Consta de células alargadas, sin pigmentación, de paredes delgadas en su interior, acompañadas de células más isodiamétricas en los límites superior (parénquima esponjoso), e inferior (hipodermis). Notorios son en esta parte de la hoja haces de esclerénquima no asociados con

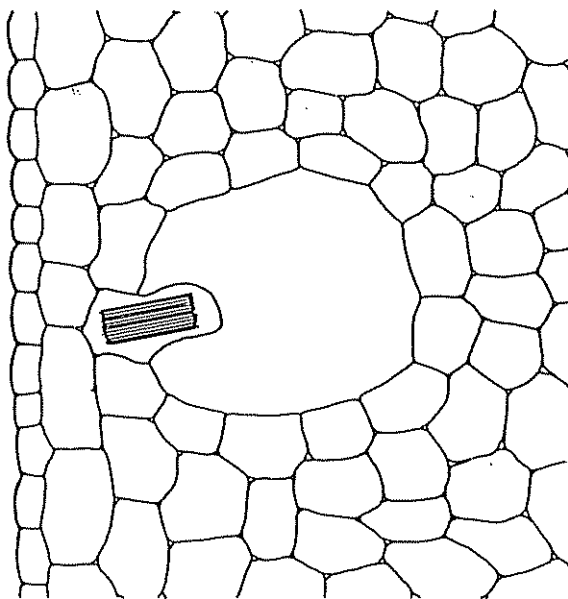


Figura 80. Idioblasto con rafidios en la nervadura central de una hoja adulta (cv. Falso Cuerno).

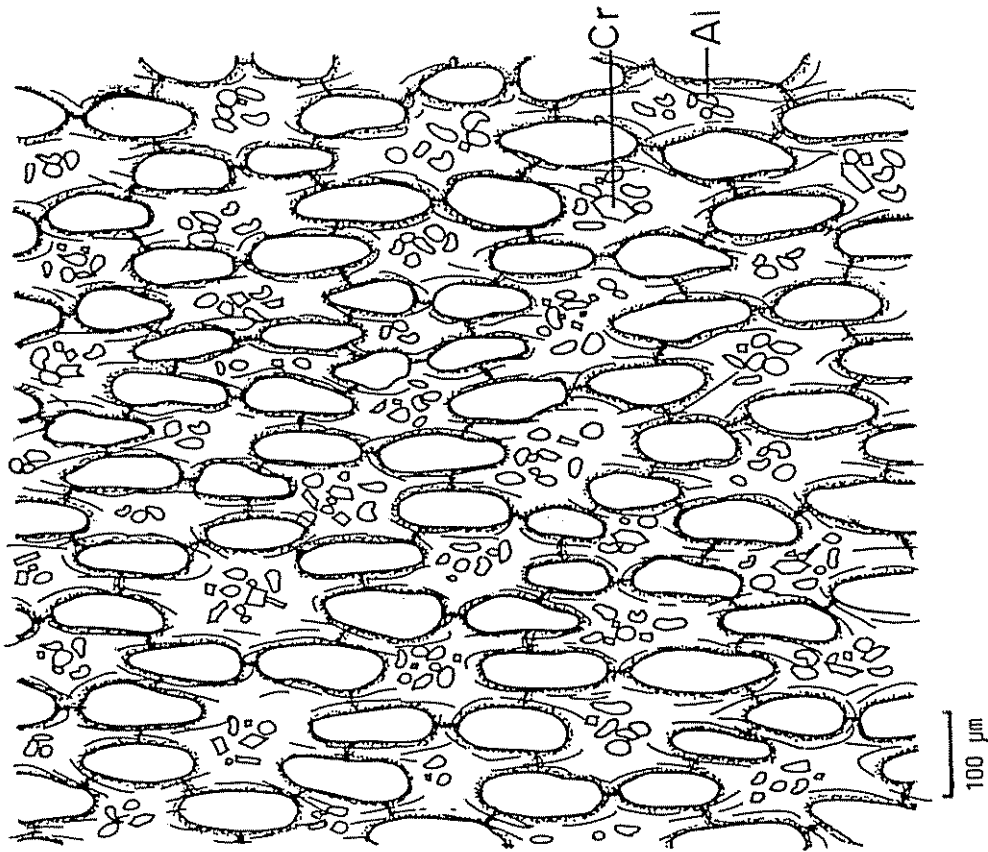


Figura 81. Tabique transversal de la vaina de una planta adulta. Las células estrelladas contienen cristales (Cr) y granos de almidón (Al); la deformación longitudinal de las células se debe a la tensión producida al madurar la vaina (cv. Pelipita).

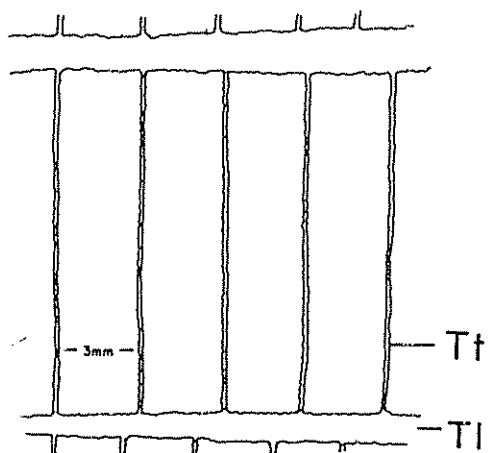


Figura 82. Esquema de un corte longitudinal de la vaina, con tabiques longitudinales (Tl) y tabiques transversales (Tt).

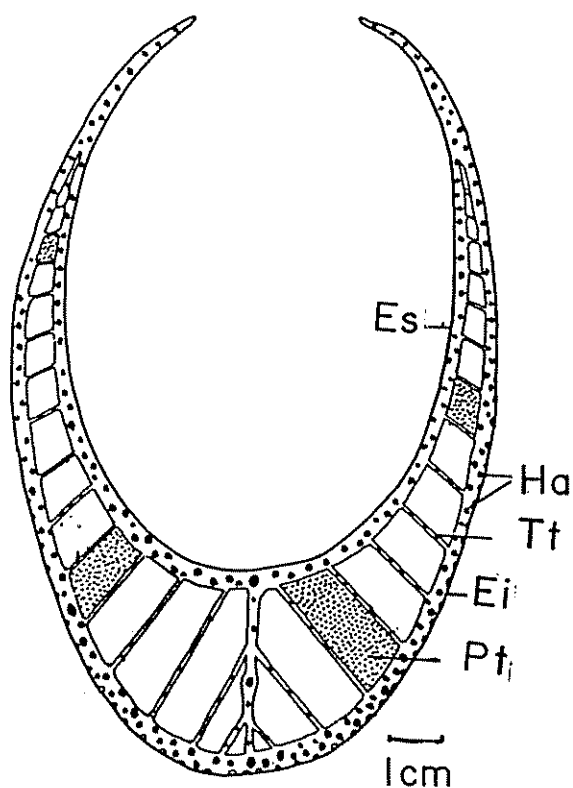


Figura 83. Dibujo esquemático de un corte transversal de la vaina cerca de un peciolo (cv. Pelipita).

Ei	Epidermis inferior
Es	Epidermis superior
Ha	Haces vasculares
Pt	Pared del tabique con parénquima estrellado
Tt	Tabique transversal

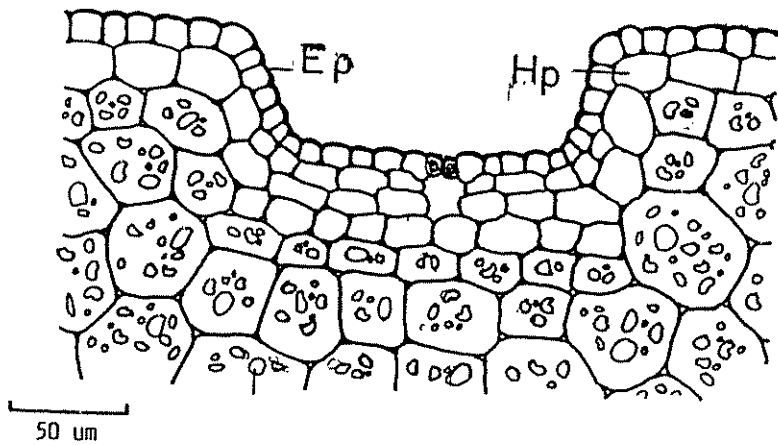


Figura 84. Corte transversal del lado adaxial de la vaina externa de una planta adulta. En el fondo se aprecia el estoma. Las células del parénquima contienen leucoplastos con depósitos de almidón (cv. Pelipita).

Ep	Epidermis
Hp	Hipodermis



Figura 85. Tipología de gránulos de almidón. (cv. Pelipita).

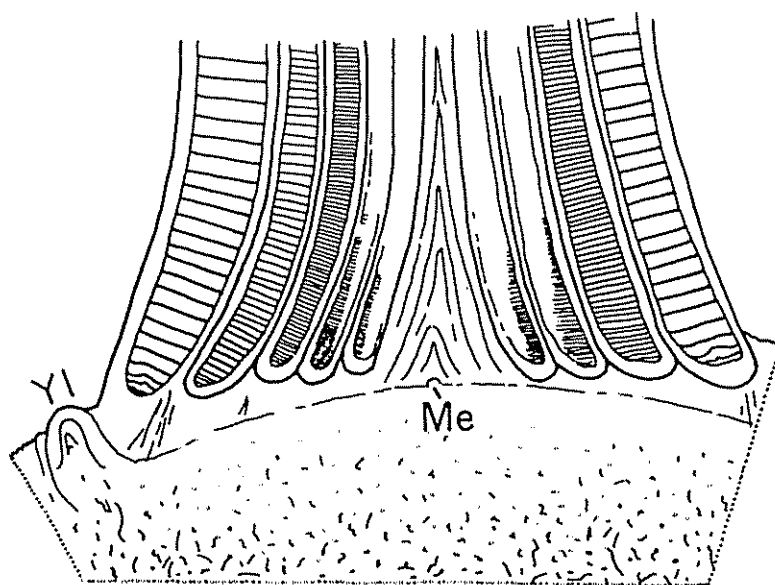


Figura 86. Corte longitudinal a través de la yema terminal de un cormo de una planta adulta con el meristema apical, la inserción de las bases foliares y una yema lateral (cv. Pelipita).

Yl Yema lateral
Me Meristema

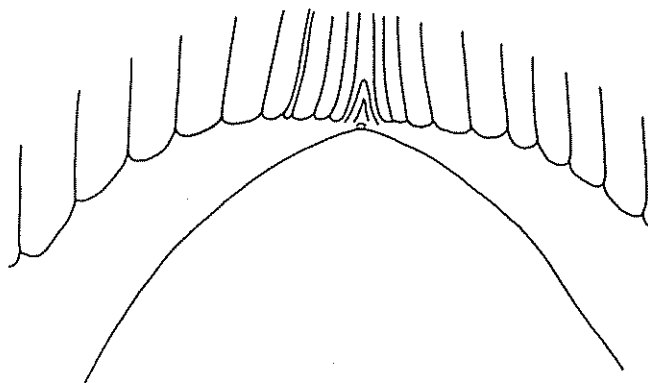


Figura 87. Esquema de un corte longitudinal del cormo con el punto vegetativo casi plano.

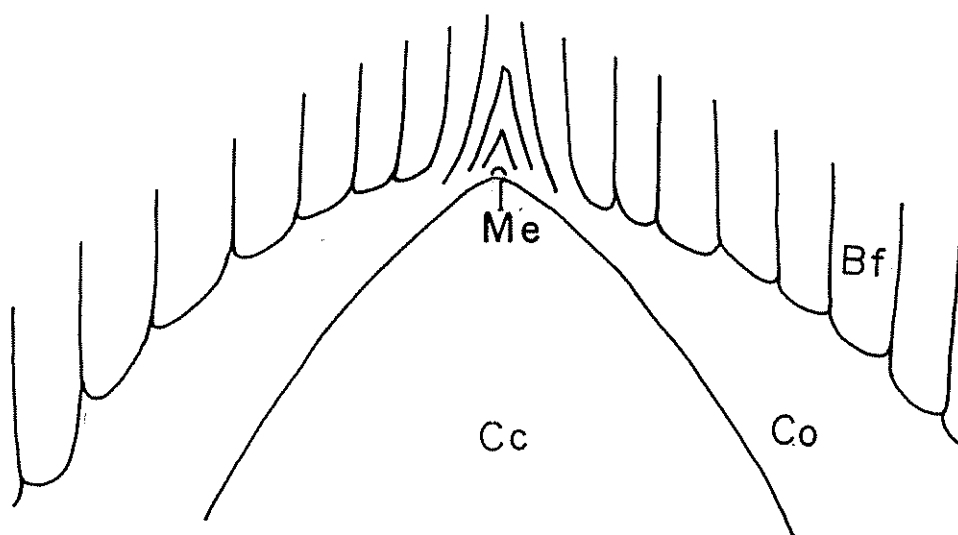
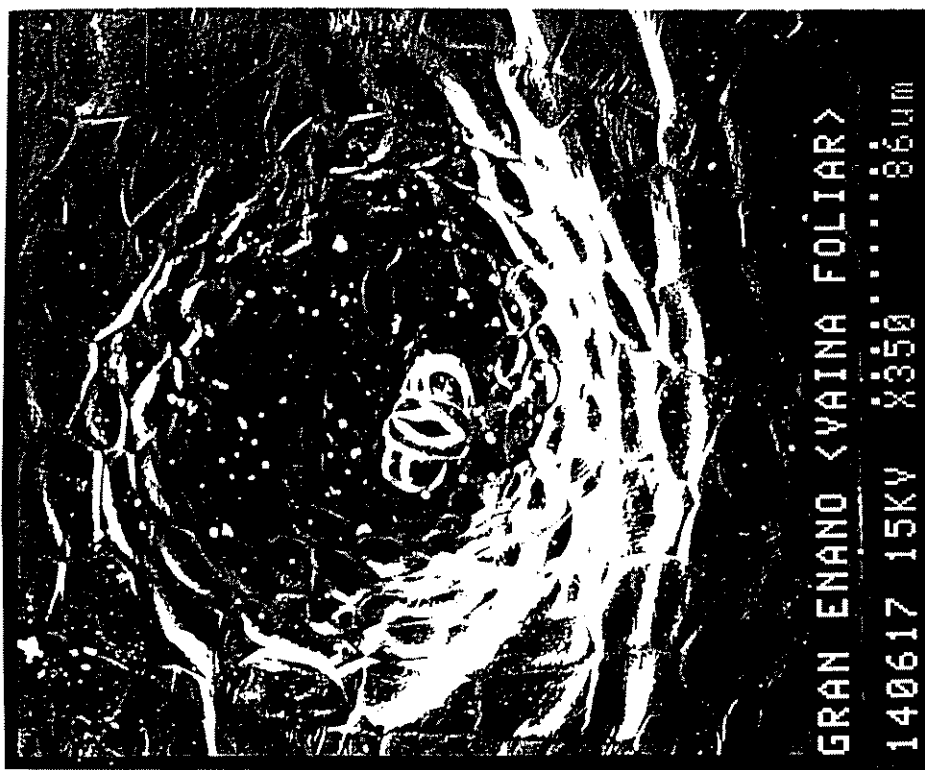


Figura 88. Esquema de un corte longitudinal del corno con el punto vegetativo algo cónico.

Cc	Cilindro central
Co	Corteza
Bf	Base foliar
Me	Meristema



B

Figura 89. Superficie interna (adaxial) de una vaina foliar. Vista de un estoma no funcional en la epidermis poco ondulada (A). Estoma en el fondo de un hoyo (B).



A

hacecillos conductores, cuya función mecánica está correlacionada con el movimiento de los semilimbos.

Las paredes de las tráqueas en la vena no están muy lignificadas. También se notó que las tráqueas en las hojas tienen engrosamiento espiralado. Las células epidermales e hipodermales presentaron, en ocasiones, muchos cristales grandes, orientados con frecuencia en el sentido de la célula. También se observaron cristales cerca de las células del parénquima en empalizada, el cual está bien diferenciado; consta de 3 a 4 estratos en la parte más profunda.

El floema consta de células muy pequeñas. Por el lado inferior, el esclerénquima es muy visible.

En luz polarizada se observó cristales individuales, localizados especialmente en las conexiones transversales. En la nervadura central de las hojas se notó gran cantidad de cristales en el parénquima estrellado (a veces más de 100 cristales en una sola célula). La configuración de cristales es muy variable (Fig. 78) y los más grandes pueden llegar a medir hasta más de 70 micrómetros. Los idioblastos con rafidios generalmente están ubicados dentro de espacios (cámaras) aeríferos y son elongados longitudinalmente (Fig. 79).

La formación de cristales en la vaina es precoz pero gradual; las dimensiones de los cristales aumentan en partes más maduras (16). Además, los rafidios están en células muy

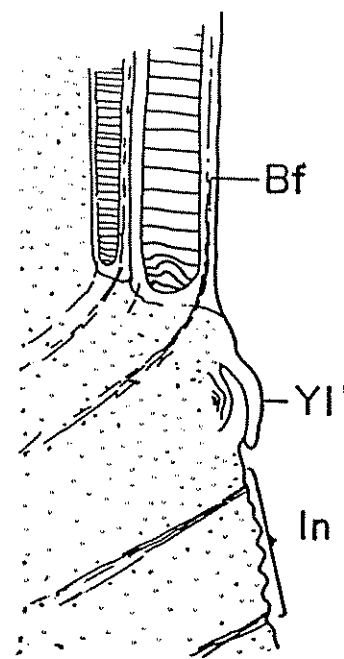


Figura 90. Corte longitudinal de la parte externa del corno a través de una yema lateral (cv. Falso Cuerno).

Bf Base foliar
 In Inserción de la vaina removida
 Yl Yema lateral

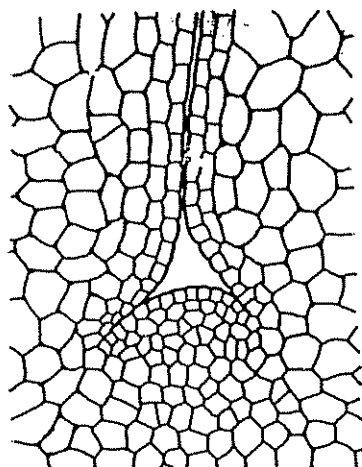


Figura 92. Corte longitudinal a través de la región meristemática de una yema lateral (cv. Pelipita).

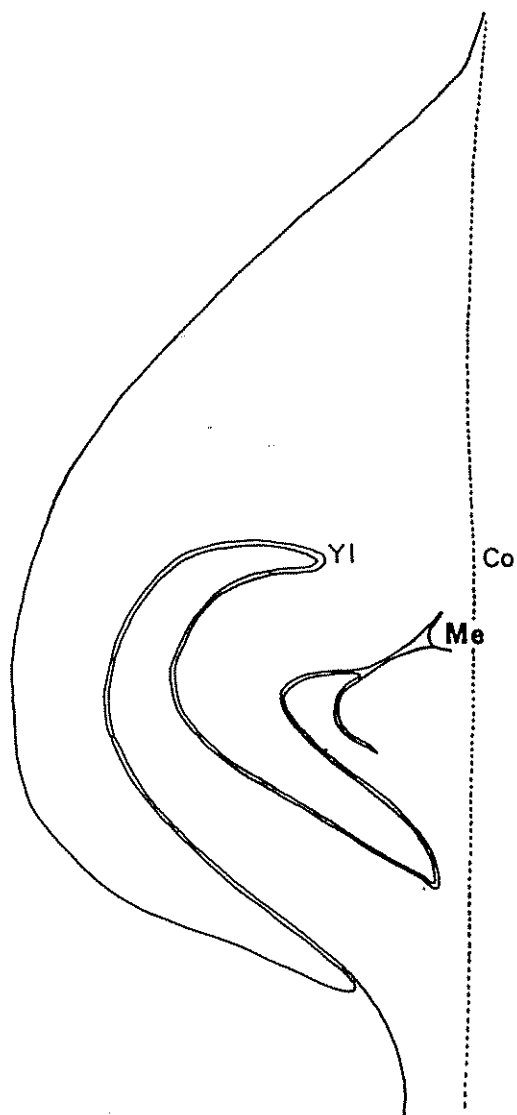


Figura 91. Esquema de un corte longitudinal a través de una yema lateral. La línea punteada indica el límite entre el cormo (Co) y yema lateral (Yl). Meristema (Me).

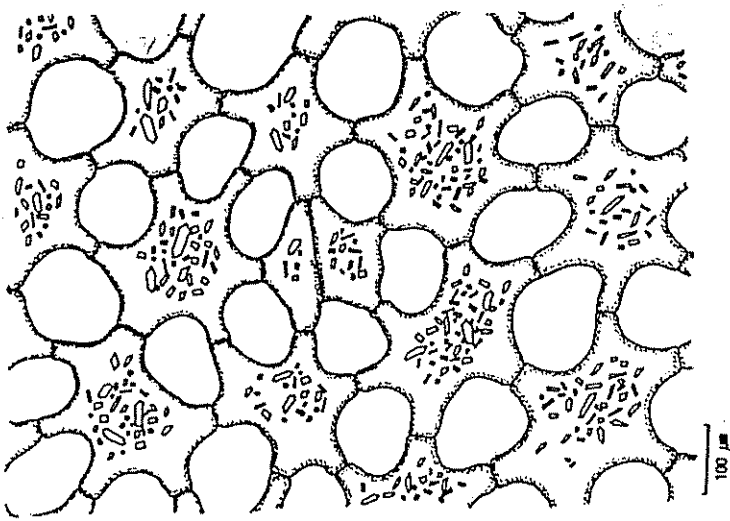


Figura 93. Parénchima estrellado atípico (espacios aeríferos redondeados) en un peciolo de una hoja adulta. Las células estrelladas contienen gran cantidad de cristales (cv. Pelipita).

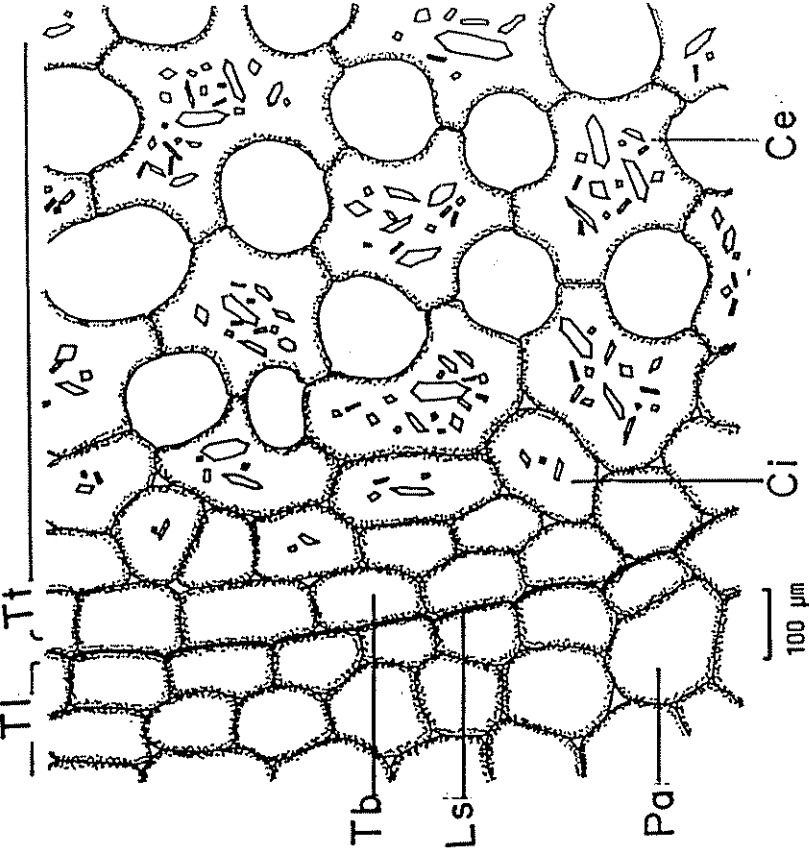


Figura 94. Iniciación del tabique transversal de parénchima estrellado en el peciolo, visto de lado (cv. Pelipita).

- Ce Célula estrellada, con cristales del tabique transversal
- Ci Célula inicial (lateral) del aerenchyma estrellado transversal
- Ls Línea separatoria entre tabique longitudinal y transversal
- Pa Parénchima del tabique longitudinal
- Tb Célula inicial (del borde lateral) del tabique transversal
- Tl Tabique longitudinal
- Tt Tabique transversal

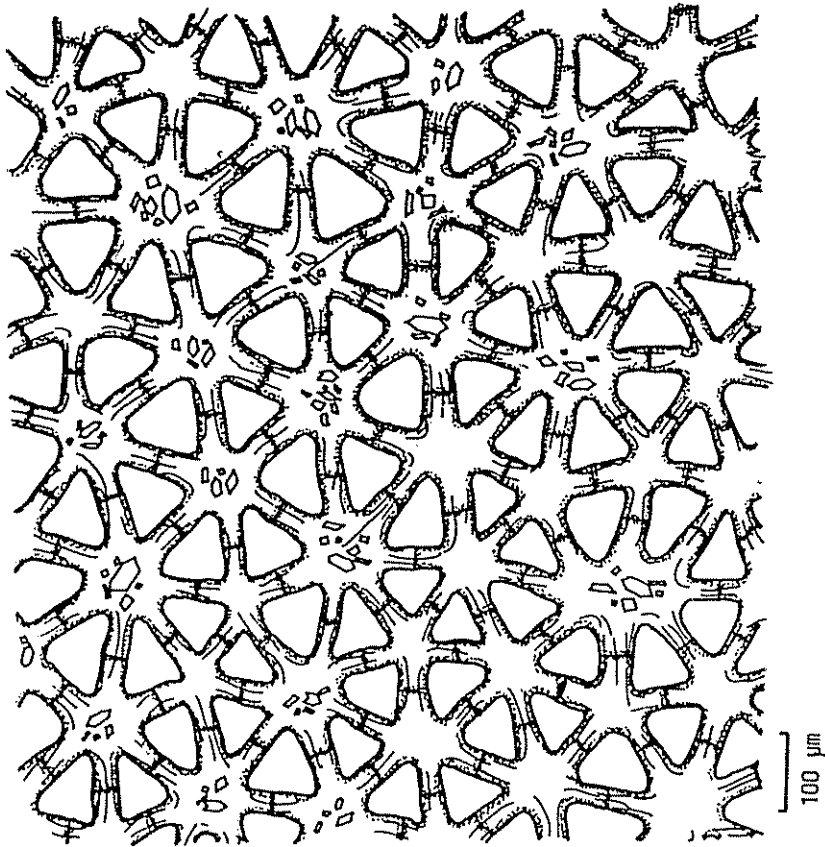


Figura 95. Tabique transversal de un peciolo de parénquima estrellado típico (cv. Pelipita).

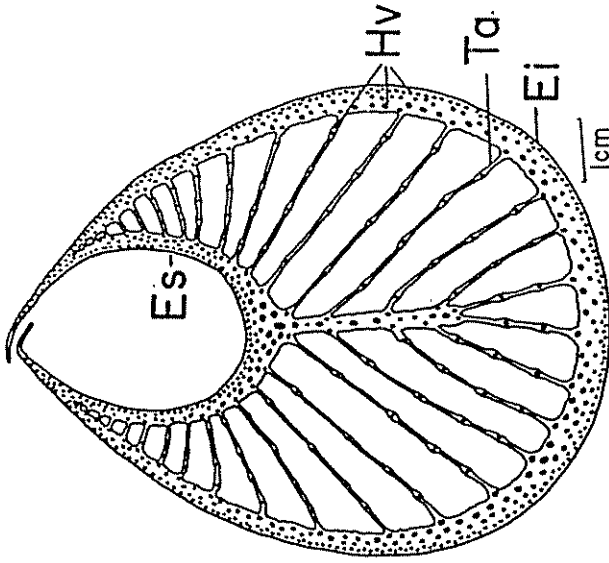


Figura 96. Esquema de la distribución de haces y tabiques en un peciolo de hoja adulta.

- Ei Epidermis inferior
- Es Epidermis superior
- Hv Haces vasculares
- Ta Tabique

especializadas y su formación cronológica, según la madurez, no es un mecanismo selectivo y pasivo de deposición, sino que es un proceso bastante complejo (16). Muchos rafidios fueron evidentes especialmente donde hay cavidades (Fig. 80).

También en la vaina, en células del parénquima estrellado, son muy evidentes los cristales (Fig. 81). La vaina presenta tabiques longitudinales y transversales (Figs. 82, 83). Asimismo, se observó gran cantidad de granos de almidón (Figs. 84, 85).

En la parte superior del cormo, entre las vainas, se localiza el ^oápice vegetativo (Fig. 86). Contrariamente a lo manifestado por Soto (96), el ápice no se encuentra en una depresión encerrada entre las bases foliares circundantes sino que está casi plano (Fig. 87) y a veces forma un cono con relación a las vainas foliares circundantes (Fig. 88).

Las vainas que conforman al pseudotallo presentan estomas ^oadaxial y abaxialmente. En la superficie abaxial se encuentran numerosos hoyos (depresiones). En cada hoyo siempre hay un estoma (Fig. 89), que es diferente a los estomas observados en las hojas; posee dos células subsidiarias y en la mayoría de los casos son no depresión. Cada depresión grande está conformada aproximadamente por unas 50 a 80 células (Fig. 89 B). Además se notó que hay estomas que no se sitúan dentro de estos hoyos y están rodeados de células superficialmente lisas (Fig. 89 A). Los hoyos varían en tamaño y son elípticos o semicirculares.

Asimismo, en la cara adaxial de las vainas se observan también estomas no funcionales, un poco hundidos, pero no localizados dentro de una cavidad. La condición atrofiada de los estomas de la parte externa y la posición de los estomas en parte interna, debida a la colocación de una vaina sobre otra al formar el pseudotallo, posiblemente les restan funcionalidad como sistema de aeración. En realidad, la funcionalidad de las depresiones de la vaina en su parte interna no es del todo comprendida.

Quitando sucesivamente cada vaina foliar se comprobó que efectivamente a cada una le corresponde una yema en el cormo cada vez de menor tamaño (con menos primordios que la cubren), pero siempre presente. Estas yemas se localizaron en el punto donde las partes basales laterales delgadas de la vaina, envolvente forman una V bastante notoria (Fig. 45 p. 117). La yema es macroscópicamente visible, y las más externas alcanzan un tamaño de más de 1 cm.

Si el cormo se corta longitudinalmente se nota que las yemas se encuentran por debajo de las bases foliares, es decir, las yemas laterales no están relacionadas con las vainas que las cubren, sino que se localizan encima del punto de inserción (Figs. 45, 46, p. 117, Figs. 90, 91). El meristema de una yema lateral (Fig. 92) es similar al meristema apical de una planta in vitro (Fig. 11, p. 72); ambos tienen la forma típica y están envueltos entre las bases de los primordios foliares.

En cortes a nivel del peciolo, el parénquima empalizada no presenta células clorofílicas. La presencia de cristales fue muy evidente (Figs. 93, 94).

En los cultivares Gran Enano y Valery (AAA) los septos separatorios en los peciolos no fueron muy estrellados. En contraste, en ABB se observó un parénquima muy estrellado, con presencia de cristales y células simétricas y unidas (Fig. 95). Esta disposición es lo que hace que esta parte del peciolo tenga una consistencia liviana pero fuerte. En este tipo de parénquima estrellado no se observó almidón en los septos. En el peciolo se contaron aproximadamente 26 septos longitudinales (Fig. 96).

5. CONCLUSIONES

Del trabajo efectuado se pueden derivar las siguientes conclusiones:

En plantas in vitro

- La morfología y anatomía de hojas de plantas in vitro difieren profundamente en varios aspectos de hojas de plantas adultas.
- Las hojas in vitro, en su anatomía, son semejantes a hojas prototipo de plantas sombreadas o sea que el parénquima es empalizada, formado por células casi isodiamétricas, se distingue poco del parénquima lagunoso y no hay alvéolos.
- La nervación paralela de la hoja in vitro tiene gran semejanza a la de hojas primarias en plántulas formadas por semilla; este tipo de nervación solamente se pierde en forma gradual durante la fase de aclimatación.
- Las hojas de plantas in vitro, debido al poco grosor de la cutícula, presencia rudimentaria de cera epicuticular y falta de engrosamiento de las paredes epidermales e hipodermas son muy susceptibles a la deshidratación.
- Existen abundantes cristales monoclinicos del monohidrato del oxalato de calcio en forma de rafidios en idioblastos, en hojas y vaina y en forma de cristales individuales pequeños.
- El cormo ya tiene la estructura del de una planta adulta, mostrando el recorrido irregular de haces conductores en el cilindro central.
- La acumulación de grandes cantidades de almidón en el cormo sugiere una eficiente absorción de los azúcares del medio nutritivo por las raíces de las plantas in vitro, mostrando ya su función como órgano de reserva.

- La estructura de las raíces de plantas in vitro se asemeja mucho a la de plántulas derivadas de semillas. Se encuentran tipos desde radiales tetrarcas hasta poliarcas, con unos 20 o más polos de floema-xilema.
- La presencia de pelos radicales en plantas in vitro es muy notoria, cubriendo las raíces hasta 10 cm a partir de un punto a poca distancia del ápice, debido a la mayor persistencia de los pelos; no se forman pelos en raíces sumergidas en el medio semisólido..
- Pueden encontrarse raíces con aerénquima lisígeno en la corteza, indicando una aeración deficiente en el medio semisólido.
- El ápice radical de una planta in vitro tiene la estructura típica de la de las gramíneas, con la presencia de un caliptrógeno bien formado; y presencia de almidón con posible función de estatolitos.
- El sistema de tubos laticíferos es poco desarrollado, pero se encuentran a veces pequeñas cantidades de gotitas de politerpenoides.

En plantas con fase de aclimatación:

- Los cambios anatómicos en las hojas durante la fase de aclimatación, son muy graduales y solamente a partir del octavo y noveno mes existe la estructura característica compartimentalizada de la hoja adulta.
/
- La gutación en hojas de plantas pequeñas ocurre al no existir hidátodos, por heridas, especialmente en la dejada por la muerte del apéndice y rajaduras finas en el borde foliar que no han sido obstruidos por exudación de mucílago.
- La extensión de cera epicuticular aumenta gradualmente en las hojas sucesivas que se forman durante la aclimatación.
- La estructura interna de las hojas empieza a transformarse gradualmente con la aparición de alvéolos pequeños en las primeras hojas formadas, que se presentan luego como cavidades grandes en la estructura compartimentalizada.

- Aparecen a veces anomalías en la estructura de la epidermis (células muy angostas y exageradamente altas sobre las venas secundarias) e hipodermis con número irregular de capas.

En plantas adultas:

- Las hojas de espada en los hijuelos no pueden considerarse primarias, sino una forma atrofiada de hojas normales debido a su nervación, saliendo todas las venas secundarias principales en ángulo agudo de la nervadura central.
- Las hojas son anfiestomáticas con tendencia a mayor número en el envés foliar, existiendo en los híbridos (AAB, ABB) una tendencia a transiciones con números variables en ambos lados de la hoja.
- El mecanismo pulvinular a lo largo de la vena central aparece solamente en hojas bien desarrolladas o adultas; falta o, de existir, no es funcional en plantas in vitro, en estadio temprano de aclimatación y en hojas de espada. Su mecanismo depende de la turgencia, plegándose los dos lados del limbo a lo largo de la vena central, lo que reduce la temperatura e insolación de la hoja.
- Hay una considerable variación de las características morfológico-anatómicas entre diferentes cultivares, entre plantas del mismo cultivar y hasta, por ejemplo, en diferentes hojas o partes de la misma hoja, lo que dificulta establecer patrones exactos.
- Los estomas en la vaina son en parte no funcionales debido a anomalías morfológico-anatómicas.
- Los hoyos (depressiones) en la epidermis abaxial de las vainas representan las antecámaras de estomas que se encuentran en su centro.
- Los tabiques transversales tienen a intervalos irregulares capas de células amilíferas intercaladas entre las estrelladas, indicando su importancia como órgano de almacenamiento de material de reserva.

- Las epidermis de diferentes vainas están adheridas entre sí por sus superficies suaves y cerosas; la presencia de líquido (agua) aumenta todavía mucho más las fuerzas de adhesión, ofreciendo así una mayor resistencia.
- El crecimiento del cormo es simpodial, la yema apical se vuelve de lado y la yema axilar continúa el eje vertical pero inmediatamente también se vuelve de lado. De esta manera se explica la posición opuesta de las yemas laterales en relación a la axila foliar.
- Al formarse el eje floral ocurre una transición de crecimiento simpodial a monopodial, ya que las flores están en las axilas de las brácteas.
- Las yemas que dan lugar a los hijuelos se derivan de las terminales por crecimiento simpodial, de la misma manera como se forma el cormo principal. Es factible ver entrenudos hasta de 1 cm en el eje de conexión entre la planta madre y el hijuelo.
- El crecimiento del ápice del tallo en la parte de la inflorescencia es indeterminado y finaliza en un meristema. La flor que en el plátano Falso Cuerno (AAB) está aparentemente en posición terminal, es realmente axilar como lo comprueba la presencia de una bráctea tectriz.
- En las raíces poliarcas jóvenes existen células con lumen grande sin diferenciarse que luego se transforman, al envejecer, en tráqueas escalariformes, cuyos refuerzos incluyen las paredes externas de las células circundantes, lo cual incrementa la resistencia.
- En los engrosamientos de las paredes de la endodermis aparecen puntuaciones ramificadas, que se conectan entre sí a través de las paredes.
- En raíces gruesas es frecuente encontrar espacios lisígenos grandes en la corteza, lo que favorece el intercambio gaseoso en lugares de poca aeración.

6. RECOMENDACION

Con base en el trabajo efectuado se propone la siguiente recomendación:

- Debido a que en esta investigación no se trató de establecer diferencias entre especies, variedades o cultivares, se recomienda realizar estudios comparativos para establecer posibles patrones morfológicos-anatómicos característicos de cada uno.

LITERATURA CITADA

1. ACQUARONE; P. 1930. The roots of Musa sapientum L.
United Fruit Co. Res. Bull. N°26.
2. ASCENSO, J. 1967. A simple technique for the
multiplication of banana planting material.
Tropical Agriculture (Trinidad) 44:243-244.
3. AUBERT, B. 1973. Particularités anatomiques liées au
comportement hydrique des bananiers. Fruits
(Francia) 28(9):589-604.
4. BANERJEE, N.; DE LANGHE, E. 1985. A tissue culture
technique for rapid clonal propagation and storage
under minimal growth conditions of Musa (banana and
plantain). Plant Cell Reports (Alemania) 4:351-
354.
5. -----; VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. 1986. Meristem
tip culture of Musa; histomorphological studies of
shoot bud proliferation. In: Withers, L. and
Alderson, P. (eds): Plant Tissue Culture and its
Agricultural Applications. Butterworths, London
(Inglaterra), pp.139-147.
6. BARKER, W. 1959. A system of maximum multiplication
of banana plants. Tropical Agriculture (Trinidad)
36(4):274-284.
7. -----; STEWARD, F.C. 1962. Growth and development
of the banana plant. 1. The growing regions of the
vegetative shoot. Annals of Botany (Inglaterra)
26(103):389-410.
8. -----; STEWARD, F.C. 1962. Growth and development
of the banana plant. II. The transition from the
vegetative to the floral shoot in Musa acuminata
cv. Gros Michel. Annals of Botany (Inglaterra)
26(103):413-422.
9. -----, 1969. Growth and development of the banana
plant. Gross leaf emergence. Annals of Botany
(Inglaterra) 33(131):523-535.

10. BERLYN, G.; MIKSCHE, J. 1976. Botanical Microtechnique and Cytochemistry. The Iowa State University Press, Ames, Iowa (E.E.U.U.). 326 p.
11. BONNEL, E.; DEMARLY, Y.; ESSAD, S. 1983. Evolution anatomique des tissus foliaires de canne à sucre (Saccharum sp.) cultivés in vitro. Canadian Journal of Botany (Canadá) 61:830-836.
12. BORGES, F.O. 1971. Tamaño y densidad de estomas en clones cultivados y especies silvestres de Musa. Agronomía Tropical (Venezuela) 21:139-143.
13. BRAINERD, K.E.; FUCHIGAMI, L. 1981. Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. Journal of the American Society for Horticultural Science. (E.E.U.U.) 106(4):515-518.
14. -----; FUCHIGAMI, L.; KWIATKOWSKI, S.; CLARK, C. 1981. Leaf anatomy and water stress of aseptically cultured 'Pixy' plum grown under different environments. HortScience (E.E.U.U.) 16:173-175.
15. -----; FUCHIGAMI, L. 1982. Stomatal functionig of in vitro and greenhouse apple leaves in darkness, mannitol, ABA, and CO₂. Journal of Experimental Botany (Inglaterra) 33:388-392.
16. BRUNI, A.; DALL'OLIO, G.; TOSI, B. 1982. Study of the development of raphide forming cells in Musa paradisiaca using fluorescence microscopy. New Phytologist (Inglaterra) 92(4):581-587.
17. CRONAUER, S.; KRIKORIAN, A. 1984. Rapid multiplication of bananas and plantains by in vitro shoot tip culture. HortScience (E.E.U.U.). 19:234-235.
18. -----; KRIKORIAN, A. 1988. Determinate floral buds of plantain (Musa AAB) as a site of adventitious shoot formation. Annals of Botany (Inglaterra) 61:507-512.

19. COOPER, C.S.; QUALLS, M. 1967. Morphology and chlorophyll content of shade and sun leaves of two legumes. *Crop Science (E.E.U.U.)* 7:672-673.
20. CHAMPION, J. 1961. Indications préliminaires sur la croissance du bananier 'Poyo'. *Fruits (Francia)* 16(4):191-194.
21. -----; OLIVIER, P. 1961. études préliminaires sur les racines de bananier. *Fruits (Francia)* 16(7): 371-374.
22. ----- . 1968. *El Plátano*. Blume, Barcelona (España). p.247.
23. -----; CHARPENTIER, J.M. 1970. La position des feuilles du bananier 'poyo'. *Fruits (Francia)* 25(7-8):508-510.
24. CHARLTON, W.A. 1982. Distribution of lateral root primordia in root tips of *Musa acuminata* colla. *Annals of Botany (Inglaterra)* 49(4):509-520.
25. CHARPENTIER, J.M. 1966. La remontée du méristème central du bananier. *Fruits (Francia)* 21(3):103-119.
26. CHEAH, K.T.; CHENG, T.Y. 1978. Histological analysis /of adventitious bud formation in cultured Douglas fir cotyledon. *American Journal of Botany (E.E.U.U.)* 65(8):845-849.
27. CHLYAH, H. 1974. étude histologique de la néoformation de méristèmes caulinaires et radiculaires, à partir de segments d'entre-noeuds de *Torenia Fournieri* cultivés *in vitro*. *Canadian Journal of Botany (Canadá)* 52:473-476.
28. DANTAS, J.; SHEPHERD, K.; ALVES, E. 1985. Eficiencia de propagación rápida de plantas de banano por medio de heridas en brotes *in vivo*. In: Resúmenes VII Reunión de la Asociación para la Cooperación en Investigaciones Bananeras en el Caribe y en América Tropical (ACORBAT). San José (Costa Rica). 130 p.

29. DAVIS, D.G. 1971. Scanning electron microscopic studies of wax formations on leaves of higher plants. *Canadian Journal of Botany* (Canada) 49:543-546.
30. DEVOS, P. 1984. De groei van de stam en het blad bij de banaanplant (*Musa* sp.): Kwantitatieve analyse en ontwikkelingsmodel. *Dissertationes de Agricultura*. Katholieke Universiteit te Leuven. Fakulteit der Landbouwwetenschappen (Belgica). 236 p.
31. DEVOS, P. 1985. The location of lateral buds of banana (*Musa* sp.) clarified by the discovery of two new types of adventitious buds within the AAB plantain group. *Fruits* (Francia) 40(7-8):471-474.
32. DE LANGHE, E. 1961. La phyllotaxie du bananier et ses conséquences pour le compréhension du système rejetonnant. *Fruits* (Francia) 16(9):429-441.
33. DONNELLY, D.; SKELTON, F.E. 1987. Hydathode structure of micropropagated plantlets and greenhouse grown 'Totem' strawberry plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. (E.E.U.U.) 112:(5)755-759.
34. -----; SKELTON, F.; NELLES, J. 1987. Hydathode anatomy and adaxial water loss in micropropagated 'Silvan' blackberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* (E.E.U.U.) / 112(3):566-569.
35. -----; VIDAVER, W. 1984. Leaf anatomy of red raspberry transferred from culture to soil. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. (E.E.U.U.) 109:172-176.
36. -----; VIDAVER, W. 1984. Pigment content and gas exchange of red raspberry *in vitro* and *ex vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science* (E.E.U.U.) 109:177-181.
37. -----; VIDAVER, W.; LEE, K. 1985. The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* (Holanda) 4:43-50.

38. DUNSTAN, D.; TURNER, K. 1984. The acclimatization of micropropagated plants. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 1. Academic Press, Inc. New York (E.E.U.U.). p. 123-129.
39. ESAU, K. 1977. Anatomy of seed plants. 2 ed. John Wiley & Sons, Inc. New York (E.E.U.U.). 550 p.
40. FAHN, A.; STOLER, S.; FIRST, T. 1963. Vegetative shoot apex in banana and zonal changes as it becomes reproductive. Botanical Gazette (E.E.U.U.) 124(4):246-250.
41. FEDER, N.; O'BRIEN, T. 1968. Plant microtechnique: some principles and new methods. American Journal of Botany (E.E.U.U.) 55(1):123-142.
42. FISCHER, J.B. 1978. Leaf opposed buds in Musa: their development and a comparison with allied monocotyledons. American Journal of Botany (E.E.U.U.) 65 (7):784-791.
43. FLORES, E.M.; SOTO, M.; BOLAÑOS, R. 1978. Variación estacional del sistema foliar de cinco clones de banano. Turrialba (Costa Rica) 35(4):339-346.
44. FONT QUER, P. 1985. Diccionario de botánica. Editorial Labor, S.A. Barcelona. 1244 p.
/
45. FONTENO, W.C.; MC. WILLIAMS, E.L. 1978. Light compensation points and acclimatization of four tropical foliage plants. Journal of the American Society for Horticultural Science (E.E.U.U.) 103(1):52-56.
46. FREEMAN, B.; TURNER, D.W. 1985. The epicuticular waxes on the organs of different varieties of banana (Musa spp.) differ in form, chemistry and concentration. Australian Journal of Botany. (Australia) 33(4):393-408.

47. GANRY, J. 1980. Action de la temperature et du rayonnement d'origine solaire sur la vitesse de croissance des feuilles du bananier Musa acuminata C.: application a l'étude du rythme de development de la plante et relation avec la productivité. Thèse de Doctorat d'Etat efet Sciences, Université de Paris VII, (Francia) 350 p.
48. GEORGE, E.; SHERRINGTON, P. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture; Hand Book and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Limited, (Inglaterra). 709 p.
49. GRANADA, C. 1988. Manejo de plantas en el invernadero. In Fundamentos Teórico-prácticos de Cultivo de Tejidos Vegetales. V.M. Villalobos ed. Laboratorio de Biotecnología, Centro de Genética, Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. (Costa Rica). p. 151-158. (en prensa).
50. GROUT, B. 1975. Wax development on leaf surfaces of Brassica oleracea var. currawong regenerated from meristem culture. Plant Science Letters (Holanda) 5:401-405.
51. -----; ASTON, M. 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration. Horticultural Resources 17:1-7.
52. -----; ASTON, M. 1977. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture II. Carbon dioxide fixation and the development of photosynthetic activity. Horticultural Resources 17:65-71.
53. -----; ASTON, M. 1978. Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. Annals of Botany (Inglaterra) 42:993-995.
54. HALPERIN, W. 1978. Organogenesis at the shoot apex. Annual Review of Plant Physiology. (E.E.U.U.) 29:239-262.

55. HAMILTON, K. 1965. Reproduction of banana from adventitious buds. *Tropical Agriculture (Trinidad)*. 42(1):69-73.
56. HARTMAN, A.N. 1928. Banana root studies. United Fruit Co. Res. Bull. N°1.
57. JARAMILLO, R. 1987. Banana and plantain production in Latin America and the Caribbean. *In*: Persley, G.; and De Langhe, E. *Banana and Plantain Breeding Strategies: Proceedings of an International Workshop held at Cairns, Australia, 13-17 october, 1986*. ACIAR. p.39-43.
58. JARRET, R.; FISCHER, J.; LITZ, R. 1985. Organ formation in *Musa* tissue cultures. *Journal of Plant Physiology (E.E.U.U.)* 121(2):123-130.
59. -----; RODRIGUEZ, W.; FERNANDEZ, R. 1985. Evaluation, tissue culture propagation and dissemination of 'Saba' and 'Pelipita' plantains in Costa Rica. *Scientia Horticulturae (Holanda)* 25:137-147.
60. ----- . 1986. *In vitro* propagation and genetic conservation of bananas and plantains. *In*: International Board for Plant Genetic Resources. Report of the Third Meeting, Roma (Italia) pp.15-33.
61. JOHNSON, B.; BRUN, W. 1966. Stomatal density and responsiveness of banana fruit stomates. *Plant Physiology (E.E.U.U.)* 41:99-101.
62. KALLARACKAL, J.; GARLICK, P. MILBURN, J. 1986. Characterization of the structural inclusions in the latex of banana *Musa*. *Canadian Journal of Botany (Canada)* 64(11):2591-2601.
63. KE, L.S. 1979. Studies on the physiological characteristics of banana in Taiwan. I. Studies on stomatal behaviour of banana leaves. *Journal of the Agricultural Association of China (China)*. 108:1-10.

64. KRIKORIAN, A.; CRONAUER, S. 1983. Técnicas de cultivo aséptico para el mejoramiento del banano y plátano. Informe Mensual. UPEB (Panamá) 7(55):42-47.
65. LEON, J. 1987. Escitamineas: Musáceas, zingiberaceas, cannáceas, marantáceas. In Botánica de los Cultivos Tropicales. 2. ed. IICA. (Costa Rica). p.88-106.
66. LOOR, C.F. 1978. Técnicas para la inducción de plantas adventicias de banano y su posible aplicación en mejoramiento genético. Tesis Facultad de Ingeniería Agronómica. Universidad Técnica de Manabí. (Ecuador). 58 p.
67. LORENZO, C.D.; PRENDES, C.; RODRIGUEZ, M.A.; BLESÁ, A.C. 1978. Contribución al estudio de la platanera canaria. Estomas y su distribución en la epidermis foliar. Anales de Edafología y Agrobiología (España) 37(11/12):1131-1144.
68. LOUWERSE, W.; ZWEERDE, W. 1977. Photosynthesis, transpiration and leaf morphology of Phaseolus vulgaris and Zea mays grown at different irradiances in artificial and sunlight. Photosynthetica (Checoslovaquia) 11(1):11-21.
69. MCGAHAN, M.W. 1961. Studies on the seed of banana II. The anatomy and morphology of the seedling of Musa balbisiana. American Journal of Botany. (E.E.U.U.) 48:630-637.
70. MILBURN, J.A.; KALLARACHAL, J. 1984. Quantitative determination of sieve tube dimensions in Ricinus, Cucumis and Musa. New Phytologist (Inglaterra) 96(3):383-395.
71. MOLINA, M.E. 1988. Sistema de propagación rápida de banano (Musa AAA). Método alternativo entre el convencional y el de cultivo de tejidos. Revista de la Asociación Bananera Nacional. ASBANA. (Costa Rica) 11(28):12-15.

72. MONNET, J.; CHARPENTIER, J.M. 1965. Le diamètre des racines adventives primaires des bananiers en fonction de leur degré de polyploidie. *Fruits (Francia)* 20:171-173.
73. MOREAU, B.; LE BOURDELLES, J. 1963. Etude du système racinaire du bananier "Gros Michel" en Equateur. *Fruits (Francia)* 18(2):71-74.
74. MUELLER, W.C.; BECHMAN, C.H. 1979. Isotropic layers in the secondary cell walls of fibers in the roots of banana and other monocotyledons. *Canadian Journal of Botany (Canada)* 57(24):2776-2781.
75. MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 15:473-497.
76. O'BRIEN, T.P.; McCULLY, M.E. 1981. The study of Plant Structure. Principles and Selected Method. Termarcarphi PTY, LTD. Melbourne (Australia). 508 p.
77. PANTASTICO, E.; PANTASTICO, J.; COSICO, V. 1975. Some forms and functions of the fruit and vegetable epidermis. *The Philippine Journal of Biology (Filipinas)* 4(3):175-197.
78. PEARCE, R.B.; LEE, D.R. 1969. Photosynthetic and morphological adaptation of alfalfa leaves to light intensity at different stages of maturity. *Crop Science (E.E.U.U.)* 9:791-794.
79. PHILIP, V.J.; NAINAR, S.A. 1988. In vitro Transformation of root meristem to shoot and plantlets in Vanilla planifolia. *Annals of Botany (Inglaterra)* 61:193-199.
80. PILLAI, S.K.; PILLAI, A. 1961. Root apical organization in Monocotyledons. Musaceae. *Journal of the Indian Botanic Society (India)* 53:444-455.

81. RAM, M.; RAM, M.; STEWARD, F.C. 1962. Growth and development of the banana plant. III. A. The origin of the inflorescence and the development of the flowers. B. The structure and development of the fruit. *Annals of Botany (Inglaterra)* 26:657-673.
82. RIOPEL, J.L. 1966. The distribution of lateral roots in Musa acuminata Gros Michel. *American Journal of Botany (E.E.U.U.)* 53(4):403-407.
83. -----; STEEVES, J. A. 1964. Studies on the roots of Musa acuminata cv. Gros Michel. 1. The anatomy and development of main roots. *Annals of Botany (Inglaterra)* 28(111):475-490.
84. ROTH, I. 1964. *Microtecnica Vegetal*. Universidad Central de Venezuela. Facultad de ciencias. Caracas (Venezuela). 88 p.
85. SANDOVAL, J. 1985. Micropropagación de musáceas. *Revista de la Asociación Bananera Nacional, ASBANA. (Costa Rica)* 9(24):21-23.
86. -----; MULLER, L. 1987. Medios de cultivo utilizados en la micropropagación de musáceas. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Turrialba (Costa Rica). 51 p. mimeografiado.
87. SCHLIENGER, C. 1987. Microscopy as a tool for plant biotechnology. *In: Nestlé Research News 1986/87*. Nestec Ltd. (Suiza). pp:105-114.
88. SHORT, K.; WARDLE, K.; GROUT, B.; SIMPKINS, I. 1984. In vitro physiology and acclimatization of aseptically cultured plantlets. *In: Proceedings Internacional Symposium Plant Tissue and Cell Culture Application to Crop Improvement*. Olomouc Czechoslovakia (24-29 september) Edited by F.J. Novak, L. Havel, J. Dolezel. Czechoslovak Academy of Sciences (Czechoslovak). p.475-486.

89. SIMMONDS, N.W. 1948. Genetic and citological studies of Musa X. Stomatal size and plant vigour in relation to polyploidy. *Journal of Genetics*. (India) 49:57-58.
90. -----, 1962. *The Evolution of the Bananas*. 1. ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. 170 p.
91. -----, 1973. *Los Plátanos*, Editorial Blume, Barcelona (España). 539 p.
92. SKUTCH, A.F. 1927. Anatomy of leaf of banana, Musa sapientum L. var. hort. 'Gros Michel'. *Botanical Gazette (E.E.U.U.)* 84:337-339.
93. -----, 1930. On the development and morphology of the leaf of the banana (Musa sapientum L.) *American Journal of Botany (E.E.U.U.)* 17:252-271.
94. -----, 1930. Unrolling of leaves of M. sapientum and some related plants and their reaction to environmental aridity. *Botanical Gazette (E.E.U.U.)* 90:337-365.
95. -----, 1932. Anatomy of the axis of the banana. *Botanical Gazette (E.E.U.U.)* 93:233-258.
96. SOTO, M. 1985. *Bananos, Cultivo y Comercialización*. Litografía e imprenta Lil, S.A. San José (Costa Rica). 627 p.
97. STOVER, R.; SIMMONDS, N. 1987. *Bananas*. 3. ed. Longman Scientific Technical. New York (E.E.U.U.). 468 p.
98. SUBRA, P.; GUILLEMOT, J. 1961. Contribution à l'étude du rhizome et des réjets du bananier. *Fruits (France)* 16(1):19-23.
99. SUTTER, E.; LANGHANS, R. 1979. Epicuticular wax formation on carnation plantlets regenerated from shoot tip culture. *Journal of the American of Society for Horticultural Science (E.E.U.U.)* 104(4):493-496.

100. -----; LANGHANS, R. 1982. Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot tip culture. *Canadian Journal of Botany (Canada)* 60:2896-2902.
101. TOMLINSON, P.B. 1962. Phylogeny of the Scitamineae - morphological and anatomical considerations. *Evolution (E.E.U.U.)* 16:192-213.
102. ----- . 1969. Anatomy of the monocotyledons III. Commelinales-Zingiberales. Oxford, Clarendon Press (Inglaterra). 250 p.
103. TURNER, D.W. 1972. Banana plant growth I. Gross morphology. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry (Australia)* 12:209-215.
104. UPEB. 1988. Principales acontecimientos de la actividad bananera mundial durante el primer semestre de 1988. Informe Mensual UPEB (Panamá) 12(86):14-18.
105. VARELA DE VEGA, A. 1972. Interpretación morfológica de las flores masculinas de algunas especies y variedades de Musa. *Revista de la Facultad de Agronomía. Macaray (Venezuela)* 6:65-78.
106. VASIL, V.; VASIL, I. 1984. Preparation of cultured tissues for scanning electron microscopy. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants.* vol 1. Academic Press, Inc. New York (E.E.U.U.) p. 738-743.
107. VUYLSTEKE, D.; DE LANGHE, E. 1985. Feasibility of in vitro propagation of banana and plantains. *Tropical Agriculture (Trinidad)* 62(4):323-328.
108. WARDLE, K.; DOBBS, E.; SHORT, K. 1983. In vitro acclimatization of aseptically cultured plantlets to humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science (E.E.U.U.)*. 108:386-389.

109. WETZSTEIN, H.; SOMMER, H. 1982. Leaf anatomy of tissue cultured Liquidambar styraciflua (Hamamelidaceae) during acclimatization. American Journal of Botany (E.E.U.U.) 69(10):1579-1586.
110. -----; SOMMER, H. 1983. Scanning electron microscopy of in vitro cultured Liquidambar styraciflua plantlets during acclimatization. Journal of the American Society for Horticultural Science (E.E.U.U.) 108:475-480.