

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

CONSERVACION DE GERMOPLASMA DE Musa sp. IN VITRO Y ESTUDIOS
MORFOLOGICOS DE PLANTAS VARIANTES DE Musa (AAB) c.v. 'CURRARE'

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

Magister Scientiae

Por

Luis Ernesto Pocasangre Enamorado

CATIE

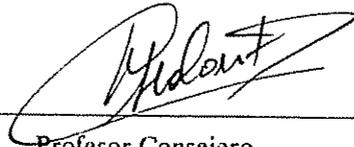
Turrialba, Costa Rica

1992

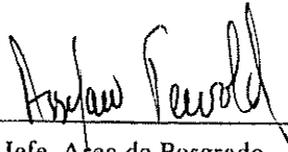
Esta tesis ha sido aceptada, en su presente forma, por la coordinación del Programa de Estudios de Posgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales Renovables del CATIE aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

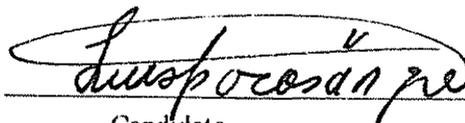


Profesor Consejero
Jean Vincent Escalant, Ph.D.



Jefe, Área de Posgrado
Assefaw Tewolde, Ph.D.

Director, Programa de Enseñanza
Ramón Lastra Rodríguez, Ph.D.



Candidato
Luis Ernesto Pocasangre

DEDICATORIA

A mis padres,

A mis hermanos,

A mis compañeros.

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi gratitud al Dr. Jean Vincent Escalant por la valiosa ayuda en la discusión de los resultados.

A los miembros del Comité Asesor por su valioso aporte en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Gilda Piaggio y Johny Pérez por la orientación en la interpretación de los análisis estadísticos.

A Nelly Vasquéz, por su valioso apoyo en los trabajos histológicos.

A Helga Rodríguez por todo su compañerismo, cariño y amistad.

INDICE

	Página
RESUMEN	x
LISTA DE CUADROS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xix
1. INTRODUCCION	1
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. Clasificación taxonómica de las musáceas	4
2.2. Morfología general de la planta	5
2.2.1. Sistema radical	6
2.2.2. El cormo	6
2.2.3. Sistema foliar	8
2.2.4. Inflorescencia	8
2.2.5. Frutos	8
2.3. Importancia de la conservación del germoplasma	9
2.4. Métodos de conservación de germoplasma	10
2.5. Métodos de conservación de germoplasma <u>in vitro</u>	12
2.5.1. Conservación a corto y mediano plazo	12
2.5.5.1. Efecto de la temperatura	13
2.5.1.2. Concentración de nutrimentos	14
2.5.1.3. Uso de agentes osmóticos	15

2.5.1.4. Inhibidores de crecimiento	16
2.5.1.5. Otros métodos de conservación	16
2.5.2. Conservación a largo plazo (Crioconservación)	18
2.6. Variación somaclonal	18
3. MATERIALES Y METODOS	23
3.1. Material vegetal	23
3.2. Multiplicación del material <u>in vitro</u>	24
3.3. Experimentos para conservar el germoplasma <u>in vitro</u>	27
3.3.1. Efecto de diferentes niveles de sacarosa	27
3.3.2. Efecto de manitol como osmorregulador	28
3.3.3. Efecto del inhibidor de crecimiento (TIBA)	29
3.4. Pruebas de sobrevivencia	29
3.5. Pruebas de peso fresco y peso seco	29
3.6. Variables evaluadas mensualmente durante el almacenamiento	30
3.6.1. Altura de la planta	30
3.6.2. Número de hojas desarrolladas	30
3.6.3. Número de raíces desarrolladas	31
3.6.4. Coloración y aspecto de la planta	31
3.7. Análisis de los datos	31
3.8. Estudios de plantas variantes <u>in vitro</u>	32
3.8.1. Recuento de estomas	32
3.8.2. Determinación del largo y ancho de los estomas	32
3.8.3. Determinación de la tasa de multiplicación	33
3.8.4. Estudios histológicos	33

3.9. Estudios de plantas variantes a nivel de invernadero	34
3.9.1. Recuento de estomas	34
3.9.2. Determinación de el largo y el ancho de los estomas	35
3.9.3. Estudios de cariotipo de los variantes	35
3.9.4. Determinación de la altura de las plantas	35
3.9.5. Identificación de algunas características fenotípicas	36
3.9.6. Estudios histológicos	37
3.10. Análisis de los datos	37
 4. RESULTADOS	 38
4.1. Experimentos de conservación de germoplasma <u>in vitro</u>	38
4.1.1. Altura	38
4.1.2. Número de hojas	46
4.1.3. Número de raíces	54
4.1.4. Coloración de las plantas	61
4.1.4.1. Efecto de niveles de sacarosa	61
4.1.4.2. Efecto de manitol a 0.2M	61
4.1.4.3. Efecto de niveles de TIBA	62
4.1.5. Relación entre el peso fresco y peso seco	64
4.1.5.1. Relación entre el peso fresco y peso seco para el ensayo con sacarosa	64
4.1.5.2. Relación entre el peso fresco y el peso seco para manitol a 0.2M en diferentes niveles de sacarosa	64

4.1.5.3. Relación entre el peso fresco y el peso seco para diferentes niveles de TIBA	65
4.1.6. Pruebas de sobrevivencia	68
4.1.6.1. Pruebas de sobrevivencia para el efecto de sacarosa	68
4.1.6.2. Pruebas de sobrevivencia para el efecto de manitol a 0.2M	68
4.1.6.3 Pruebas de sobrevivencia para el efecto(TIBA)	69
4.1.7. Comparación del incremento experimentado en las variables evaluadas después de 6 meses de almacenamiento a 15°C	69
4.2. Estudio de variantes a nivel <u>in vitro</u> e invernadero	74
4.2.1. Estudios histológicos	74
4.2.2. Recuento de estomas	78
4.2.3. Análisis de cariotipo de variantes en invernadero	82
4.2.4. Determinación de la tasa de multiplicación	83
4.2.5. Estudio de algunas característica morfológicas en variantes a nivel de invernadero	84
5. DISCUSION	91
5.1. Experimentos para la conservación de germoplasma	91

5.2. Estudio de variantes a nivel <u>in vitro</u> e invernadero	96
5.2.1. Estudios histológicos	96
5.2.2. Recuento de estomas y tamaño (largo y ancho)	98
5.2.3. Estudios de cariotipo	100
5.2.4. Tasa de multiplicación	102
5.2.5. Estudio de algunas características morfológicas entre los variantes a nivel de invernadero	103
6. CONCLUSIONES	107
7. RECOMENDACIONES	109
8. LITERATURA CITADA	111
9. ANEXOS	117

POCASANGRE, L.E. 1992. Conservación de germoplasma de Musa sp. in vitro y estudios morfológicos de plantas variantes de Musa (AAB) c.v. 'Currare'. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, C.R. 135 p.

RESUMEN

Se realizaron ensayos de conservación de germoplasma in vitro en dos cultivares de Musa sp. y estudios morfológicos en plantas variantes de plátano Musa (AAB) c.v. 'Currare'. Para los experimentos de conservación se evaluaron tres sustancias (sacarosa, manitol y ácido triiodobenzoico) en diferentes concentraciones, durante 6 meses de almacenamiento a una temperatura de conservación de 15°C. Los tratamientos que presentaron mejores resultados fueron 30 g/l de sacarosa; 5 g/l de sacarosa +0.2M de manitol y 5 mg/l de ácido triiodobenzoico. Concentraciones superiores a 20 mg/l de TIBA y concentraciones de 0.2M de manitol en combinación con niveles de sacarosa superiores a 20 g/l, fueron perjudiciales para el almacenamiento de los cultivares 'Currare' y 'Gran Enano', puesto que presentaron porcentajes de sobrevivencia inferiores al 70%. El cultivar 'Currare', fue ligeramente más tolerante al efecto de las sustancias reguladoras del crecimiento y a la acción de la temperatura de conservación.

Para los estudios morfológicos en plantas variantes de plátano en dos condiciones de crecimiento (in vitro e invernadero). Se

realizaron recuentos de estomas en los variantes enano, gigante y un testigo, encontrándose que la cantidad de estomas por unidad de superficie fue muy similar entre los variantes y el testigo, en ambas condiciones de crecimiento. En cuanto al tamaño de los estomas tampoco se encontraron diferencias en el largo y el ancho entre los variantes. Por otro lado, los estudios histológicos en la lámina y la vaina foliar, tampoco detectaron diferencias en la anatomía interna de los variantes y del testigo, tanto a nivel in vitro, como en invernadero. Por otra parte, la tasa de multiplicación tampoco permitió detectar diferencias. En general en condiciones in vitro, no se pueden detectar diferencias visuales que permitan identificar los variantes de el testigo. En condiciones de invernadero a un mes de crecimiento, con facilidad se puede identificar el variante gigante, de el enano y de el testigo, principalmente por la diferencia en la estatura de la planta. Probablemente, el hecho de que no se pudieran identificar los variantes enanos, se debió a que la planta testigo corresponde a un semi-enano del cultivar 'Currare'. En condiciones de invernadero los parámetros más útiles para identificar los variantes son: la longitud de los peciolos, el índice foliar y la estatura de la planta.

En cuanto al estudio de cariotipo, aunque fueron pocas las células evaluadas, se encontró que tanto en los variantes como en el testigo ocurren anomalías en el número de cromosomas.

POCASANGRE, L.E. 1992. Conservation of germplasm of Musa sp. in vitro and morphological studies of plant variants of Musa (AAB) c.v. 'Currare'. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, C. R. 135 p.

SUMMARY

Experiments of conservation of germplasm in vitro in two cultivars of Musa sp. and morphological studies in plant variants of plantain Musa (AAB) c.v. 'Currare' have been realised. For the experiments of conservation three substances (sucrose, manitol and triiodobenzoic acid) in different concentrations were evaluated during six months of storage at a conservation temperature of 15°C. The treatments that gave the best results were 30 g/l of sucrose; 5 g/l of sucrose +0.2M of manitol and 5 mg/l of triiodobenzoic acid (TIBA). Concentrations of more than 20 mg/l of TIBA and concentrations of 0.2M of manitol in combination with levels of sucrose higher than 20 g/l, were detrimental to the storage of the cultivars of 'Currare' and 'Grand Naine', because they presented percentages of survival less than 70 %. The cultivar 'Currare' was slightly more tolerant to the effect of the growth regulating substances and to the action of the conservation temperature.

For the morphological studies in plant variants of plantain in two conditions of growth (in vitro and in greenhouses), recounts of stomata in the variants naine, giant and a check, have been realised. It was found that the quantity of stomata per unit of

surface was similar between the variants and the check, in both conditions of growth. In relation to the size of the stomata, no differences were found in the length and width between the variants. On the other hand, the histological studies in the blade and foliar sheath did not detect differences in the internal anatomy of the variants and the check, both at the level of the in vitro and in the greenhouse. Neither did the multiplication rate permit detection of differences. In general, in conditions in vitro it is impossible to detect visual differences that permit distinction between the variants and the check. In greenhouse conditions, at one month of growth, it is possible to identify the giant variant of the naine and the check, mainly by the stature of the plant. The fact that it is impossible to identify the naine variants, is probably due to the check plant corresponding to a semi-naine of the cultivar 'Currare'. In greenhouse conditions the most useful parameters for identifying the variants are: the length of the petioles, the foliar index and the height of the plants.

Although few cells have been evaluated, the study of cariotype found that abnormalities in the number of chromosomes occur in the variants as well as in the check plants.

POCASANGRE, L. E. 1992. Conservation de germplasma de Musa sp. in vitro et études morphologiques de variants de Musa (AAB) c.v. 'Currare'. Tesis. Mag. Sc. CATIE, Turrialba, C.R. 135 p.

RESUME

Ce travail peut se diviser en deux parties l'une concernant la conservation in vitro de germplasma de Musa sp.; la deuxième traitant des études morphologiques réalisées sur des variants du bananier plantain Musa AAB c.v. 'Currare'. En ce qui concerne la conservation 3 substances ont été évaluées (saccharose, manitol, et acide tri-iodo benzoïque) à différentes concentrations sur une période de 6 mois à une température de 15°C. Les traitements ayant donné les meilleurs résultats furent saccharose 30 g/l ; saccharose 5 g/l + 0.2M de manitol y 5 mg/l d'acide tri-iodo benzoïque(TIBA). Les concentrations supérieures à 20 mg/l de TIBA comme les traitements contenant 0.2M de mannitol en association avec de doses de saccharose supérieures à 20 g/l, se sont révélés préjudiciables pour la conservation des deux cultivars 'Currare' et 'Grande Naine' avec des pourcentages de récupération inférieurs à 70 %. Le cultivar 'Currare' étant légèrement plus tolérant à l'action des régulateurs de croissance et à la température de conservation

Les études morphologiques sur variants ont été réalisées sur du matériel en croissance in vitro et en acclimatation en serre. Des

comptages de stomates effectués sur les variants nains, géants et sur le témoin ont permis de mettre en évidence que la quantité de stomates est très voisine quels que soient le type de plante observé et les conditions de croissance. Aucune différence n'a pu être mise en évidence considérant la taille des stomates : largeur et longueur. Les études histologiques de l'anatomie interne des limbes et des gaines foliaires n'ont pas permis de détecter des différences entre les variants et le témoin; ceux-ci tant au niveau in vitro qu'en acclimatation en serre. De la même façon, les taux de multiplication n'ont pas permis de détecter de différences. D'une façon générale, il n'est pas possible de détecter des différences visuelles qui permettent d'identifier les variants en conditions in vitro. Par contre au niveau des plantes en serre, il est possible de séparer avec facilité, les variants géants des variants nains et du témoin, considérant pour cela principalement la hauteur de la plante. Le fait qu'il soit difficile de séparer les plantes naines des plants témoins provient certainement du fait que le témoin est en fait une variété semi-nain du cultivar 'Currare'. En conditions d'acclimatation, les paramètres les plus utiles pour identifier les variants sont: la longueur du pétiole, l'indice foliaire et la hauteur de la plante.

En ce qui concerne les études de caryotypes, bien que le nombre de cellules observées soit faible, on a pu mettre en évidence des anomalies dans le nombre de chromosomes aussi bien chez les variants que chez les témoins.

LISTA DE CUADROS

página

- Cuadro 1. Altura promedio (Cm) obtenida con diferentes dosis de sacarosa (5,10,15,20,30 g/l) en dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15°C comparado con el testigo absoluto 30 g/l sacarosa a 27 °C (TA). 40
- Cuadro 2. Altura promedio (Cm) obtenida en presencia de manitol a una concentración de 0.2M evaluado en 5 niveles de sacarosa(5,10,15,20,30) en dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15 °C comparado con testigo absoluto 30g/l sacarosa a 27°C (TA). 42
- Cuadro 3. Altura promedio (Cm) en presencia de TIBA en dos cultivares dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15 °C comparados con el testigo absoluto 30 g/l de sacarosa a 27°C (TA). 44
- Cuadro 4. Número promedio de hojas producidas a diferentes concentraciones de sacarosa en dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30 g/l de sacarosa a 27 °C (TA). 48
- Cuadro 5. Número promedio de hojas producidas a una concentración de 0.2M de manitol en diferentes niveles de sacarosa en dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30g/l de sacarosa a 27°C (TA). 50

Cuadro 6. Número promedio de hojas producidas a diferentes concentraciones de TIBA en dos cultivares de <u>Musa</u> durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30 g/l de sacarosa a 27 °C (TA).	52
Cuadro 7. Número promedio de raíces producidas a diferentes concentraciones de sacarosa en dos cultivares de <u>Musa</u> , durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30 g/l de sacarosa a 27°C (TA).	55
Cuadro 8. Número promedio de raíces producidas en presencia a 0.2M de manitol en diferentes concentraciones de sacarosa, en dos cultivares de <u>Musa</u> , durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30 g/l de sacarosa a 27°C (TA).	57
Cuadro 9. Número promedio de hojas producidas en presencia de diferentes concentraciones de TIBA, en dos cultivares de <u>Musa</u> , durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30 g/l de sacarosa a 27°C (TA).	59
Cuadro 10. Pesos frescos, pesos secos(g) y relación entre el peso fresco y peso seco de las plantas en presencia de sacarosa, manitol y TIBA, en dos cultivares de <u>Musa</u> , al finalizar 6 meses de almacenamiento a 15°C.	66
Cuadro 11. Pruebas de sobrevivencia para el efecto de sacarosa manitol y ácido triiodobenzóico en dos cultivares de <u>Musa</u> , durante un mes a 27°C, después de 6 meses de almacenamiento.	71

Cuadro 12. Incremento en altura, número de hojas, número de raíces relación peso fresco peso seco, y porcentaje de sobrevivencia, debido al efecto de sacarosa, manitol y TIBA, en dos cultivares de <u>Musa</u> al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C.	73
Cuadro.13 Comparación del número promedio de estomas en plantas variantes de plátano 'Currare' en dos estados de crecimiento (<u>in vitro</u> e invernadero).	78
Cuadro.14. Comparación del ancho y del largo (μm) de los estomas entre los variantes, en dos estados de crecimiento (<u>in vitro</u> e invernadero).	79
Cuadro 15. Análisis de cariotipo de variantes de 'Currare' comparadas con el testigo en plantas en invernadero.	82
Cuadro 16. Prueba de Duncan para comparar las medias de la tasa de multiplicación entre variantes.	83
Cuadro 17. Comparación de algunas características morfológicas entre el testigo, enano y gigante a 3 meses de crecimiento en invernadero.	86

LISTA DE FIGURAS

página

- Fig. 1. Esquema de una planta de Musa en fructificación con sus rebrotes y detalles de las hojas segun Champion, 1968. 7
- Fig. 2. Esquema general de las fases que comprende la micropropagación en Musa. 26
- Fig. 3. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la altura (Cm.) de dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C), a 3 meses (TA). 41
- Fig. 4. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la altura (Cm.) de dos cultivares de Musa, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA). 41
- Fig. 5. Efecto de manitol a 0.2M en la altura(Cm) de dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) evaluado durante 3 meses. 43
- Fig. 6. Efecto de manitol a 0.2M en la altura(Cm) de dos cultivares de Musa al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses. 43

- Fig. 7. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la altura(Cm) de dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) evaluado durante 3 meses (TA). 45
- Fig. 8. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la altura(Cm)de dos cultivares de Musa, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA). 45
- Fig. 9. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la formación de hojas de dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C),a 3 meses (TA). 49
- Fig. 10. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la formación de hojas de dos cultivares de Musa, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA). 49
- Fig. 11. Efecto de manitol a 0.2M en la formación de hojas de dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) evaluado durante 3 meses. 51
- Fig. 12. Efecto de manitol a 0.2M en la formación de hojas de dos cultivares de Musa al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol a 15°C (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA). 51

- Fig. 13. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la formación de hojas de dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA). 53
- Fig. 14. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la formación de hojas de dos cultivares de Musa, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA). 53
- Fig.15. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la formación de raíces de dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C), a 1 mes (TA). 56
- Fig. 16. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la formación de raíces de dos cultivares de Musa, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA). 56
- Fig. 17. Efecto de manitol a 0.2M en la formación de raíces de dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA). 58
- Fig. 18. Efecto de manitol a 0.2M en la formación de raíces de dos cultivares de Musa, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA). 58

- Fig. 19. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la formación de raíces de dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA). 60
- Fig. 20. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la formación de raíces de dos cultivares de Musa, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA). 60
- Fig. 21. Porcentajes para la coloración de plantas debido al efecto de la sacarosa(A), manitol(B) y TIBA(C), en dos cultivares de Musa al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C. 63
- Fig. 22. Porcentajes de peso seco de plantas debido al efecto de sacarosa(A), manitol(B) y TIBA (C), en dos cultivares de Musa, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C. 67
- Fig. 23. Porcentajes de sobrevivencia debido al efecto de sacarosa(A), manitol(B) y TIBA(C), en dos cultivares de Musa, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C. 72
- Fig. 24. Secciones transversales de la lámina foliar de Musa en plantas testigo, enano y gigante, en dos estados de crecimiento (in vitro e invernadero), observadas a 10X. 76
- Fig. 25. Secciones trnsversales de la vaina foliar de Musa en plantas testigo, enano y gigante, en dos estados de crecimiento (in vitro e invernadero), observadas a 4X. 77

- Fig. 26. Vistas paradermales de secciones de la lámina foliar de Musa, que ilustran los estomas de las plantas testigo, enano y gigante a nivel in vitro y de invernadero, observadas a 10X. 81
- Fig. 27. Altura (Cm) de plantas, enanas, testigo y gigante a 3 meses de crecimiento en el invernadero. 87
- Fig. 28. Longitud, ancho e índice foliar de plantas enanas, testigo y gigante a 3 meses de crecimiento en el invernadero. 88
- Fig. 29. Longitud (Cm) del peciolo de la hoja de plantas enano, testigo y gigante a 3 meses de crecimiento en invernadero. 89
- Fig. 30. Angulo de inserción de la hoja de plantas enano, testigo y gigante a 3 meses de crecimiento en invernadero. 90

1. INTRODUCCION

El banano (Musa AAA) y el plátano (Musa AAB, ABB), junto con la yuca (*Manihot esculenta*), constituyen la principal fuente alimenticia de los países del trópico húmedo de América, África y Asia (Thurston, 1989). La producción mundial de Musa ssp., se estima en más de 64 millones de toneladas anuales, de las cuales 26 millones son producidas en América Latina y El Caribe (INIBAP, 1989).

Con la modernización de la agricultura, los rendimientos de los cultivos alimenticios se han incrementado; paralelo a éste hecho la base genética se ha reducido rápidamente, debido a el abandono de variedades tradicionales, siembra de monocultivos genéticamente homogéneos y cambios en las prácticas de cultivo. El género Musa no ha sido la excepción, se ha informado que cultivares de plátano (AAB) y banano (AAA, AA) han desaparecido debido a la deforestación, desastres naturales y agricultura nómada (Jaramillo, 1983). Ante ésta problemática la conservación del germoplasma ha cobrado prioridad para mantener la base genética necesaria para los programas de fitomejoramiento (IBPGR, 1983)

Todo método de conservación de germoplasma debe garantizar la viabilidad y la regeneración rápida del material almacenado así como su estabilidad genética. Dentro de los métodos de conservación el almacenamiento de semillas en cámaras frías es apropiado debido

a que ocupa poco espacio, facilita el intercambio de germoplasma y es económico. Sin embargo, no todas las semillas resisten niveles de deshidratación para ser almacenadas. En el caso del género Musa esta metodología no es posible, debido a que los cultivares comerciales no producen semillas. Las colecciones de campo han sido el método tradicional de conservación en musáceas. Sin embargo, las colecciones están expuestas a ataques de plagas y enfermedades, problemas edáficos, ocupan áreas considerables y los costos de mantenimiento son altos (Withers, 1980; Withers, 1990; Villalobos y Abdelnour, 1991)

En Musa el almacenamiento in vitro es una alternativa complementaria a las colecciones de campo, puesto que presenta ventajas tales como: sanidad del material, ahorro de espacio, se puede almacenar muchas introducciones, fácil transporte del germoplasma y requiere menores costos de mantenimiento (Sandoval y Muller, 1989). El problema del almacenamiento en Musa es su alta tasa de crecimiento, lo que obliga a multiplicar y subcultivar el material cada 4 a 5 semanas, que resulta una tarea laboriosa y aumenta los costos de almacenamiento. Paralelo a éste problema al incrementar el número de subcultivos se corre el riesgo de contaminaciones, pérdida de material y asimismo favorece la aparición de plantas fuera de tipo o variación somaclonal (Scowcroft, 1984; Smith, 1988)

El termino variación somaclonal se ha empleado para describir la variabilidad generada en células y tejidos cultivados in vitro. La variación somaclonal puede ser temporal epigenética o variación genética (mutación). Las plantas variantes en la mayoría de los casos no tienen importancia económica; por lo tanto es urgente desarrollar metodologías que permitan su precóz identificación

Consecuentemente, los objetivos de la presente investigación fueron:

Desarrollar una metodología que permitiera la conservación a mediano plazo de dos cultivares de Musa sp. (Musa AAA c.v. 'Gran Enano' y Musa AAB c.v. 'Currare')

determinar la sobrevivencia del material vegetal después de concluído el periodo de almacenamiento.

Adquirir conocimientos de plantas variantes de Musa (AAB) c.v. 'Currare' a nivel in vitro y de invernadero para facilitar su precóz identificación.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Clasificación taxonómica de las Musáceas

El banano y los plátanos pertenecen al orden Zingiberales y a la familia Musaceae, que a su vez se divide en dos géneros: Musa y Ensete. El género Ensete, posee plantas vigorosas y muy parecidas a las plantas del género Musa, pero se diferencian por no presentar ramificaciones en el cormo. Ensete se reproduce por semillas y su uso es ornamental (Soto, 1990).

El género Musa según Stover y Simmonds (1987), está constituido por cuatro secciones o series : *Australimusa*, *Callimusa*, *Rhodochlamys*, y *Eumusa* . La serie *Eumusa* tiene un número cromosómico básico $n=11$ y es la de mayor difusión geográfica, está constituida por nueve a diez especies, de las cuales Musa acuminata(AA) y Musa balbisiana (BB), en cruzamientos interespecíficos han originado la mayoría de los cultivares comestibles.

Los híbridos interespecíficos se agrupan de acuerdo a la contribución de cada una de las especies a la ploidía. Dependiendo de la combinación de genomas se clasifican en: diploides, triploides y tetraploides. En la naturaleza se han identificado los grupos AA, AB, BB, AAA, AAB, ABB (Stover y Simmonds, 1987).

Los bananos y plátanos comestibles en su mayoría son triploides, que se encuentran en los grupos (AAA), (AAB) y (ABB). El grupo (AAA) contiene los subgrupos: a) 'Gros Michel' b) 'Cavendish' que contiene los cultivares (Gran Enano, Valery y Lacatán) c) 'Red "Red Green". El Grupo (AAB), contiene los plátanos (tipo falso cuerno, tipo francés). El grupo (ABB), contiene los cultivares 'Pelipita', 'Saba' y 'Bluggoe' (Simmonds, 1973 ; Soto, 1990).

El desarrollo de nuevos cultivares probablemente dependa del uso de una base genética más amplia del germoplasma diploide Musa acuminata y Musa balbisiana, de la selección de los híbridos existentes y del uso de otras especies silvestres como material inicial (Shepherd et al, 1986).

2.2 Morfología general de la planta

Los bananos y los plátanos son plantas herbáceas conseudotallos aéreos que se originan de cormos carnosos en los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales o hijos. Las hojas tienen una distribución helicoidal (Filotaxia espiral) y las bases foliares circundan el tallo(cormo), dando origen alseudotallo. La inflorescencia es terminal y resulta de la transformación del meristemo vegetativo en meristemo floral; después de la diferenciación floral, la producción de hojas cesa definitivamente (Fig. 1).

2.2.1 Sistema radical

Las raíces poseen forma de cordón y aparecen en grupos de 3 ó 4; el diámetro oscila entre 5-10 mm y pueden alcanzar de 5 a 10 m. de longitud. Las raíces jóvenes son blancas y suaves, más tarde adquieren color amarillento y se endurecen, al madurar se tornan oscuras y suberosas. El número de raíces está relacionado con el tamaño del tallo, debido a que el desarrollo de raíces adventicias está correlacionado con el nivel de auxinas y éstas se sintetizan en las hojas jóvenes. La formación de raíces disminuye al momento de la floración, aunque continúan desarrollándose las que fueron preformadas. El 65 % del sistema radicular se encuentra localizado en los primeros 30 cm. del suelo (Soto, 1990).

2.2.2 El cormo

Morfológicamente el cormo es un tallo que desarrolla hojas en la parte superior y raíces adventicias en la parte inferior. El cormo de las musaceas es corto , grueso y carnoso, debido a la cantidad de parenquima. Los nudos en el cormo están muy agrupados y en cada uno hay una hoja que se extiende hasta cubrirlo. El cormo está constituido en su mayor parte por parenquima amiláceo y se pueden distinguir dos zonas: la parte externa o cortical que desempeña un papel de protección y la parte central o activa de la cual se originan el sistema aéreo, el sistema radical y los retoños (Soto, 1990).

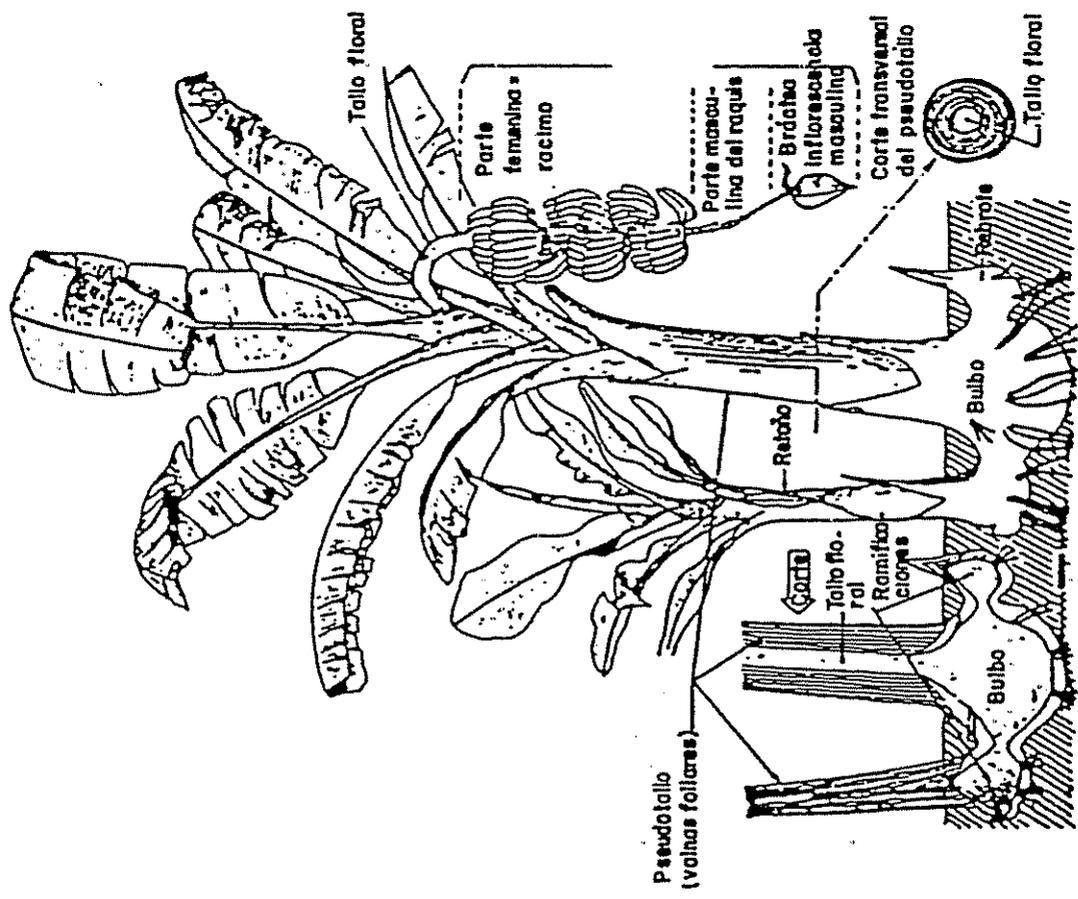
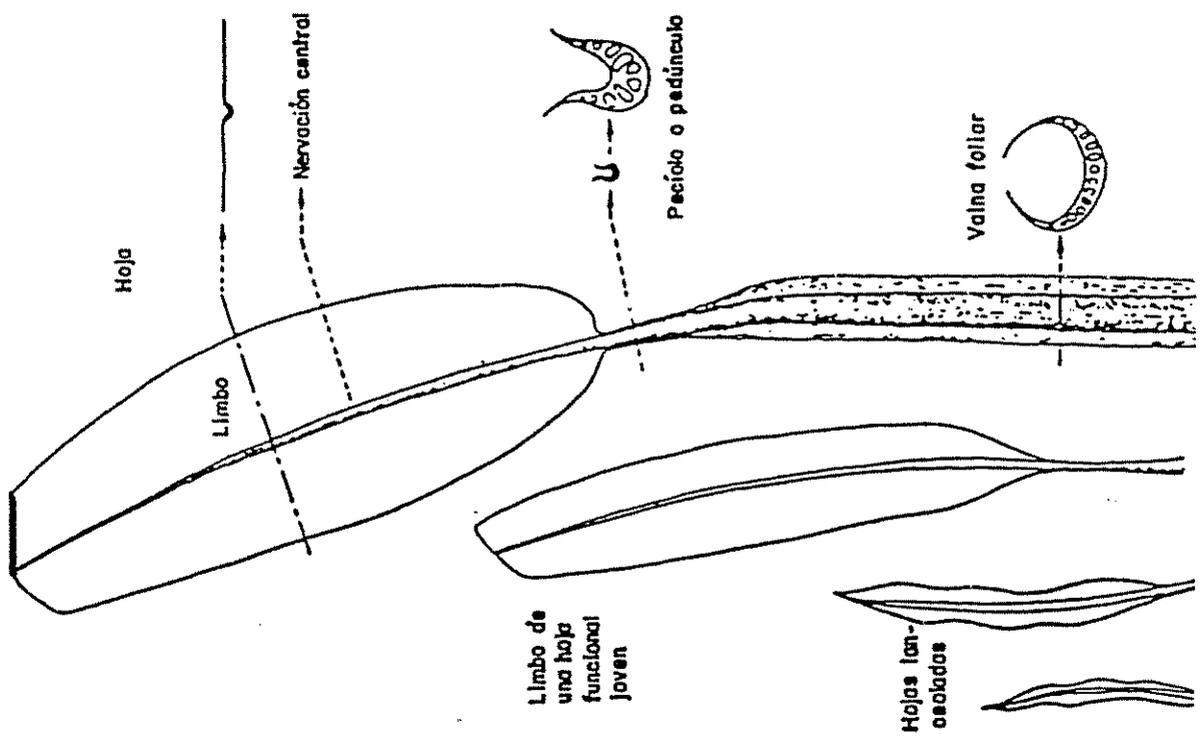


Fig. 1. Esquema de una planta de *Musa* en fructificación con sus rebrotes y detalles de hojas según Champion, 1968.

2.2.3 Sistema foliar

La hoja consta de vaina foliar, pseudopeciolo y lámina . las hojas están distribuidas en forma de espiral. Las largas base foliares se traslapan y forman el pseudotallo, a través del cual crece la inflorescencia terminal. Las vainas foliares son largas sin lígula y están constituidas por una epidermis glabra en ambas superficies ; tienen numerosos espacios airíferos que se prolongan hasta la vena media. Los peciolo en el extremo distal de la vaina se estrecha y se adelgaza hacia el limbo. La lámina foliar es dorsiventral y glabra, muy verde en el haz y más o menos glauca en el envés (Soto, 1990).

2.2.4. Inflorescencia

La inflorescencia es una espiga compleja y consiste de pedúnculo, donde las flores se encuentran arregladas en racimos nodales en dos filas de cojines transversos, cada uno sostenido por una bráctea ovalada y rojiza. Los racimos florales nacen en espiral y no rodean al pedúnculo. De 12 a 20 flores son producidas por nudo. los primeros 5 a 15 nudos basales o manos producen flores femeninas y los nudos distales flores masculinas estaminadas (Purseglove,1981).

2.2.5. Frutos

El desarrollo del fruto de los cultivares comerciales es partenocárpico (sin polinización). El tiempo desde la aparición del

racimo hasta la cosecha oscila entre 90 a 120 días. En la primera semana del desarrollo del fruto hay poco aumento en la pulpa, dos semanas después el número de células en la pulpa se ha aumentado mediante divisiones mitóticas. El desarrollo dentro del lóculo es irregular pero se llena de pulpa comestible entre las 8 y 12 semanas. El hecho de que la mayoría de los cultivares comestibles de banano no tengan semilla, se debe a un complejo de causas; es probable que los genes específicos de esterilidad femenina y la triploidia sean los responsables principales en distintos grados de ésta condición (Soto, 1990).

2.3. Importancia de la conservación del germoplasma

Los recursos fitogenéticos son recursos naturales limitados y perecederos, que proporcionan la materia prima o genes que apropiadamente manipulados y combinados con prácticas de mejoramiento convencionales, cultivo de tejidos o a través de ingeniería genética pueden generar variedades mejoradas. (Esquinas, 1981).

Con la modernización de la agricultura se ha logrado el incremento del rendimiento de los cultivos alimenticios; pero en la mayoría de los casos, éste hecho viene acompañado con la reducción de la base genética y en algunos casos con la extinción de algunas especies de valor incalculable. La erosión genética no sólo afecta a las especies cultivadas sino a todas las especies silvestres. (Plucknett et al, 1983; Esquinas, 1981).

Consecuentemente, la creación de bancos de germoplasma representa una alternativa para la conservación de los recursos genéticos. Esta necesidad ha sido destacada por el Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos (CIRF o IPCRI). Por otra parte, La Red Internacional para el Mejoramiento de Banano y Plátano (INIBAP), identificó los problemas más comunes para la conservación e investigación de éstos cultivos en América Latina y El Caribe y recomendó realizar las siguientes acciones: a) establecer una colección de referencia de los cultivares de la región, b) caracterizar y evaluar el material existente en los países, con el objeto de establecer una nomenclatura uniforme c) duplicar las colecciones nacionales y seleccionar un laboratorio para la conservación d) organizar programas de capacitación en taxonomía y manejo de germoplasma en lugares donde se tengan colecciones (REUNION REGIONAL DE INIBAP PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE, 1987).

2.4. Métodos de conservación de germoplasma

La estrategia de conservación de germoplasma depende de la naturaleza del material biológico, que a su vez está definida por: la duración del ciclo de vida, el tipo de reproducción, el tamaño de los individuos y el nivel ecológico: silvestre y/o domesticado (Scowcroft, 1984). Querol (1988), considera que la manera más apropiada (biológicamente) de conservar los recursos genéticos es preservarlos en su medio natural in situ, por que las especies coexisten con los organismos vivos en su ambiente natural. Sin

embargo, diferentes experiencias han demostrado que para garantizar la existencia de los recursos genéticos se requiere de otros métodos de conservación tales como: bancos de semillas, colecciones de campo, conservación in vitro y crioconservación. Cualquiera que sea el método de conservación debe garantizar la identidad genética, la viabilidad y altos porcentajes de sobrevivencia (Banerjee y De Langhe, 1985; Sandoval y Muller, 1989).

El almacenamiento de semillas en cámaras a bajas temperaturas es un eficiente método de conservación a mediano y largo plazo. Sin embargo, solamente puede utilizarse para semillas ortodoxas, puesto que las semillas recalcitrantes no permiten niveles de deshidratación y temperaturas bajas para ser almacenadas. Por otra parte, existen cultivos que no producen semillas o si las producen el porcentaje de germinación es bajo. Por ejemplo: el banano y la uva. Además existe una gran cantidad de especies en las cuales su propagación es asexual o vegetativa, que también es el caso del banano, lo cual obliga a buscar otros métodos no convencionales de conservación (Withers, 1980 ; Stushnoff y Fear, 1985).

La conservación de germoplasma in vitro es complementaria al método convencional de colecciones vivas, puesto que presenta ventajas como: a) se puede almacenar un alto número de clones en poco espacio, b) asegura mejor sanidad del germoplasma, c) genera mayor número de plantas en un tiempo dado d) fácil manejo lo cual favorece el intercambio del germoplasma, e) requiere menores costos

de mantenimiento (Sandoval, 1985; Sandoval y Muller, 1989 ; Mora, 1987 ; Stushnoff y Fear, 1985).

2.5. Métodos de conservación de germoplasma in vitro

El almacenamiento de germoplasma in vitro puede realizarse de dos formas: disminuyendo la tasa normal de crecimiento o suprimiéndola totalmente mediante la criopreservación. La primera forma se puede lograr mediante la reducción en la concentración de los nutrientes en el medio; uso de agentes osmorreguladores e inhibidores de crecimiento y por manipulación de factores físicos como: reducciones de la temperatura, luz, intercambio de gases. Esta metodología es aplicable para almacenamiento a corto y mediano plazo. La criopreservación o almacenamiento en nitrógeno líquido (-196 °C), es un método de conservación a largo plazo, donde se suprime totalmente el metabolismo celular; lo cual elimina la oportunidad de cambios genéticos durante el período de almacenamiento (Withers, 1980; Scowcroft, 1984; Roca et al, 1991).

2.5.1. Conservación a corto y mediano plazo

Esta técnica consiste en conservar el germoplasma sin subcultivarlo, durante periodos de tiempo entre 3 meses a dos años. Existen dos enfoques para la conservación a corto-mediano plazo: a) Mantener el cultivo bajo condiciones de crecimiento normal y continuo b) mantener el cultivo bajo condiciones de crecimiento limitado. Este último se puede lograr mediante

manipulaciones de factores químicos y físicos en el medio de cultivo a continuación se detallan algunos procedimientos:

2.5.1.1. Efecto de la temperatura.

La reducción de la temperatura ha sido el recurso más utilizado para disminuir el crecimiento de los cultivos. La mayoría de los cultivos *in vitro* son mantenidos a temperaturas entre 20 a 30 °C; a temperaturas más bajas el crecimiento disminuye, pero ésta reducción depende de la especie en cuestión (Withers, 1980).

Banerjee y de Langhe (1985) trabajaron con 7 cultivares de Musa dos de banano(AAA) y 5 de plátano (AAB, ABB), encontrando que temperaturas inferiores a 10 °C, fueron perjudiciales para el almacenamiento *in vitro* . Sin embargo, Temperaturas de 15 a 18 °C fueron efectivas para almacenar el material hasta por 13-17 meses. Por otra parte, los genotipo AAB (c.v. Asamiensa, Agbagba, y Ntanga) y el genotipo ABB (c.v.Bluggoe), fueron más tolerantes al efecto de la temperatura que los genotipos AAA (c.v. Cavendish enano y Pisang nangka). Resultados similares fueron obtenidos por Núñez et al (1988), quienes encontraron que temperatura de 27°C favorecieron el crecimiento en altura en 12 a 15 cms en dos meses de almacenamiento. Mientras que en temperaturas de 16°C, sólo se obtuvo un crecimiento de 5 cms en 6 meses de almacenamiento.

2.5.1.2 Concentración de nutrimentos

Los nutrimentos minerales (macro y micronutrientes), se consideran esenciales para el crecimiento de las plantas. En la formulación de los medios más recientes, se destaca las concentraciones relativamente altas de nitrógeno y potasio para favorecer el crecimiento de los cultivos (Mroginski y Roca, 1991).

La relación entre la concentración de carbohidratos y los componentes nitrógenados en el medio nutritivo, pueden tener efectos sobre la tasa de crecimiento en los cultivos in vitro. La sacarosa tiene igualmente un efecto en la viabilidad de los cultivos; concentraciones muy altas o muy baja resultan nocivas para la conservación de tejidos in vitro (Roca et al, 1991).

Roca et al(1991), informaron que la tasa de crecimiento de tallos y nudos en cultivos de yuca disminuye cuándo el contenido total de nitrógeno en el medio decrece hasta 22 mM a 27-28 °C y hasta 40 mM a 20-22 °C. Concentraciones inferiores a 10 mM. son detrimentales para el almacenamiento in vitro.

Kartha et al (1981), encontraron que es posible almacenar hasta por 2 años plantas de café provenientes de cultivo de tejidos, sin usar sacarosa en el medio de cultivo.

2.5.1.3 Uso de agentes osmóticos

El efecto de los agentes osmorreguladores como el manitol, sorbitol, y azúcares como la sacarosa y glucosa, influyen en el crecimiento debido a que modifican el potencial osmótico del medio, ya que el movimiento de los nutrimentos y del agua dentro y fuera de las células está gobernado por las concentraciones relativas de las sustancias disueltas en la solución del medio de cultivo. (Brown *et al*, 1979).

Mora *et al* (1988), encontraron que concentraciones altas de sacarosa en el medio limitan el crecimiento de explantes de Musa. Mora (1987) Trabajó con los cultivares 'Gran Enano'(AAA), 'Currare'(AAB) y 'Pelipita'(ABB), sembró explantes a en un medio Murashige y Skoog(1962), suplementado con sacarosa (0,15,30,60,y 90 g/l), Manitol (0,20,40,60 y 80 g/l),almacenados a 27°C, encontrando que la ausencia de sacarosa aún en presencia de manitol causó la muerte de los explantes. La combinación de 60g/l de sacarosa + 40 g/l de manitol(=0.219M), redujo el crecimiento de los explantes en un 75% con respecto al testigo; mientras que niveles de 60 y 80 g/l de manitol(0.329M y 0.439M respectivamente) y cualquier cantidad de sacarosa causó la muerte de los explantes.

Roca *et al* (1991), encontraron que la combinación de manitol al 1% más sacarosa al 1%, redujo la tasa de crecimiento de plantas de yuca in vitro, pero al cabo de 12 meses se presentaron efectos nocivos. En cambio, el uso de sorbitol en vez de manitol también redujo la tasa de crecimiento pero no disminuyó la viabilidad de la

yuca, lográndose tiempos de almacenamiento hasta de 18 meses sin necesidad de subcultivos.

2.5.1.4 Inhibidores de crecimiento

Los inhibidores de crecimiento causan un efecto opuesto a las giberilinas, disminuyendo el crecimiento de tallos y hojas que se deriva de la acción del proceso de división y crecimiento celular de la región subapical (Murashige y Skoog, 1965). El efecto de los inhibidores de crecimiento en muchos casos puede ser eliminado con la aplicación de giberelinas (Baldev et al, 1965).

Los inhibidores de crecimiento como el ácido abscisico (ABA) interactúan con las concentraciones de sacarosa y la temperatura de almacenamiento afectando la viabilidad de los cultivos in vitro. Entre los inhibidores más empleados por los investigadores se encuentran el ácido abscisico (ABA), el ácido triiodobenzoico (TIBA), el cycocel (CCC), el ácido acetil salisílico (ASA), la hidracida maleica (MA), el ácido succínico, 2-2- dimetil maleica (ALAR), el cloruro de fosfonio (clorfoniom) etc.(Roca et al, 1991).

2.5.1.5 Otros métodos de conservación

Se ha comprobado que gases tales como etileno, oxígeno y nitrógeno pueden modificar las tasas de crecimiento en cultivos

in vitro, la manipulación de éstos gases puede usarse con fines de conservación de germoplasma. Hillel *et al* (1989) trabajaron con esquejes de crisantemo realizaron aplicaciones de 10µl/l de etileno en diferentes concentraciones de oxígeno disuelto en el medio (0, 2.5, 5.0 y 8 mg/l), encontraron que en concentraciones de 0 y 2.5 mg/l de oxígeno disuelto, disminuyeron el crecimiento y la formación de raíces en los esquejes. Sin embargo, ellos consideran que éste efecto inhibitor se debe a las condiciones de bajas concentraciones de oxígeno en el medio más que a las aplicaciones de etileno.

Jouve *et al* (1991) lograron conservar retoños de *Coffea arabica* L. durante 4 meses in vitro, mediante disminuciones de temperaturas (27,21,12 y 4 °C) y por aplicaciones de una capa de parafina en los cultivos. Se encontró que a 4 °C en cultivos sin parafina y con parafina los retoños se murieron. A temperaturas de 27,21,12 °C, cuando se usó parafina se disminuyó el crecimiento de los retoños. Sin embargo, la disminución fue igual independientemente de la temperatura utilizada, lo cual sugiere que la inhibición del crecimiento se debió a la falta de oxígeno disponible en el medio.

El inconveniente de la técnica de conservación con parafina es que la cantidad de oxígeno disponible para los explantes no es conocida y es difícilmente controlable. Por otro lado, el crecimiento de las plantas durante la fase de sobrevivencia es más lento.

2.5.2 Conservación a largo plazo (Crioconservación)

Cuándo se conserva germoplasma a largo plazo siempre existe un riesgo de inestabilidad genética. Este problema puede minimizarse de dos formas: a) utilizando como explante tejidos organizados (meristemas, yemas y cultivos derivados) b) mediante crioconservación en nitrógeno líquido (-196 °C). Se ha demostrado que a -196°C ,el metabolismo celular ha cesado completamente, por lo que se aduce que la inestabilidad genética se ha eliminado (Roca et al, 1991). Esta técnica ha tenido éxito en almacenamiento de embriones cigóticos y somáticos, suspensiones celulares, protoplastos, ápices, meristemas, ovulos y anteras (Withers, 1980 ; Scrowcroft, 1984). En el caso específico de el género Musa, se ha reportado la crioconservación de suspensiones celulares del cultivar 'Matavia'(Panis et al,1990) y de embriones cigóticos de dos diploides de Musa acuminata (AA) y Musa balbisiana (BB) (Abdelnour et al,1992).

2.6. Variación somaclonal

El concepto de variación somaclonal fue acuñado por Larkin y Scrowcroft (1981), para describir la variabilidad genética generada en plantas producidas in vitro. La variación somaclonal puede causar una variación temporal (epigenética) o una variación genética estable. Los cambios epigenéticos no se transmiten meioticamente, por tal razón no son útiles en el fitomejoramiento.

La frecuencia en la aparición de la variación somaclonal es superior a la tasa de ocurrencia de mutaciones espontáneas y/o inducidas, lo que sugiere que la variación somaclonal es una nueva fuente de variabilidad, que puede tener un impacto potencial en el mejoramiento vegetal (Tabares et al, 1991 ; Larkin y Scowcroft, 1981).

Dentro de las posibles causas de la variación somaclonal se encuentran : cambios de cariotipo, elementos transposones, aberraciones cromosómicas, amplificación y supresión de la acción de genes. Sin embargo el origen de la variación no siempre es clara, y puede variar, según el cultivar propagado e incluso puede diferir de una planta a otra de el mismo cultivar (Scowcroft, 1984 ; Lee y Phillips, 1988; Tabares et al, 1991).

En el caso de banano del subgrupo Cavendish (AAA) cultivar Gran Enano, diferentes autores en distintos países han reportado porcentajes de variación somaclonal en un amplio rango: 1.1% en Costa Rica (Arias y Valverde, 1986 y 1988), 3% en Taiwan (Hwang, 1987), 9% en Israel (Israeli et al, 1988), 19% en Puerto Rico (Pool e Irizarry, 1987), 22% en Australia (Smith, 1988), 25% en Jamaica (Stover, 1988). Las variaciones reportadas incluyen : variaciones en altura de la planta, anormalidades del follaje, variaciones en pigmentación del seudotallo y anormalidades en inflorescencias y frutos. En todos los casos la variación en altura es la más común y dentro de ésta el enanismo es el predominante,

representando el 90 % del total de los variantes (Israeli et al, 1991).

Reuveni (1988), trabajó con variantes somaclonales de banano c.v. Williams. Realizó aplicaciones de ácido giberélico en concentraciones de 0-10 mg/l sobre variantes enanos de 9 semanas de crecimiento in vitro comparados con un testigo. Encontró que el ácido giberélico redujo la producción de hojas tanto en plantas enanos como en el testigo. Sin embargo, el efecto fue más pronunciado en las plantas testigo. El mismo autor realizó recuentos de estomas en el haz y envés de plantas variantes de follaje (mosaicos), comparadas con plantas testigo. Los resultados demostraron que la cantidad de estomas fue inferior en ambas superficies (haz, envés) en los variantes que en el testigo. Por otro lado, la cantidad de estomas fue superior en el envés que en haz tanto en los variantes como en el testigo.

Estudios citológicos demostraron que los variantes de follaje presentaron aumento en el número de ploidia entre 35-37 cromosomas. El incremento en ploidia, también se asocia con la reducción del número de estomas y con un incremento del espesor de la hoja (Reuveni, 1988).

Para estudios de identificación de variantes somaclonales se recomienda realizar trabajos sobre el tamaño y distribución de los estomas; estudios sobre el tamaño y forma de las células

epidérmicas, estudios de cariotipo y ensayos de diagnóstico a nivel molecular (Reuveni, 1988 ; Sandoval et al, 1991).

Smith (1988), realizó una revisión de los factores que influyen en la inestabilidad genética de plantas micropropagadas de banano subgrupo Cavendish señalando los siguientes: a) la generación de plantas a partir de la formación de callo incrementa el % de variación b) la frecuencia de la variación aumenta a medida que se aumenta los ciclos de multiplicación del cultivo c) depende del genotipo propagado d) la composición del medio de cultivo, particularmente la concentración de reguladores de crecimiento del cultivo e) el estado fenológico de la planta donadora del explante.

La mayoría de los trabajos en variantes en musáceas se refieren a los cultivares triploides (AAA). Por tal razón las técnicas de identificación en los cultivares de plátano (AAB) y (ABB) no están sistematizadas como en el caso de algunos cultivares (AAA). Además la tecnología de identificación generada en bananos no puede ser extrapolada directamente a los cultivares de plátanos (Vuylsteke et al, 1988 ; Sandoval et al 1991).

Vuylsteke et al (1988), realizaron evaluaciones de las variaciones fenotípicas de plantas micropropagadas de plátano (Musa AAB.), encontrando una frecuencia de variación de 6%, expresado en 5 variaciones fenotípicas: dos a nivel de racimo (reversión inflorescencia masculina tipo French e inflorescencia Monganga), y

tres variantes de follaje (hojas péndulas, hojas variegadas y deformaciones en la lámina de la hoja). El variante más común fue la reversión a tipo French, 2.9% del 6% de la variación obtenida o sea un 45% de todos los variantes.

Sandoval et al (1991), evaluaron a nivel de campo plantas micropagadas del c.v. 'Falso Cuerno', provenientes de 5 subcultivos o ciclos de propagación (S1,S2,S3,S4,S5), los resultados indicaron que no hubo correlación entre mayor número de subcultivos y mayor porcentaje de variación. Además se encontró que el porcentaje total de variación fue de 14.2 y 10.8 % para la primera y segunda generación respectivamente. El variante más frecuentemente fue el enanismo que constituyó el 36 y 37% de todos los variantes en la primera y segunda generación respectivamente. Esto indica que el enanismo es estable genéticamente y que no obedece a cambios epigenéticos y que es poco influenciado por las condiciones ambientales (Sandoval et al,1991).

3. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y de Histología de la Unidad de Biotecnología, del Programa de Producción y Desarrollo de Agricultura Sostenible del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. El estudio se desarrolló en el periodo comprendido entre abril 1991 hasta septiembre 1992.

3.1 Material vegetal

Para los trabajos de conservación in vitro de germoplasma los cultivares utilizados para la investigación fueron:

'Gran Enano' (AAA), subgrupo Cavendish

'Currare' (AAB), subgrupo Plantain

Este material experimental fue obtenido de La Finca Experimental del CATIE, La Lola y de las plantaciones comerciales de 28 Millas, propiedad de CORBANA.

Para el estudio morfológico de plantas variantes, tanto a nivel in vitro como de invernadero se utilizaron dos tipos de variante del cultivar 'Currare' (variante gigante y variante enano), comparados con el material testigo, los cuales a continuación se describen:

CODIGO	DESCRIPCION
Lo-C	Planta de porte gigante con seudotallo de color rojo y fruto con reversión French.
Lo-D	Planta de porte enano, racimo falso cuerno y coloración normal
Lo-G	Planta de porte intermedio, con seudotallos de coloración verde, racimo falso cuerno. Característico del cultivar 'Currare Enano' que fue sembrado inicialmente (Testigo)

Este material fue obtenido del ensayo de variación somaclonal de la finca Experimental de CATIE, La Lola.

3.2 Multiplicación del material in vitro

Para obtener el material experimental se realizaron tres pasos: a) establecimiento del cultivo in vitro, b) multiplicación de los brotes y c) desarrollo de plantas individuales (Fig. 2) . A continuación se describe el protocolo utilizado para cada paso:

Para la obtención del material de campo se seleccionaron plantas sanas y vigorosas de donde se extrajeron hijuelos de espada entre 30 y 45 cm. de alto. Se eliminaron las partes externas del cormo y vainas foliares hasta obtener secciones de 5 cm de largo y 2 cm. de diámetro. Este material fue lavado con agua corriente, posteriormente fue sometido a una desinfección con

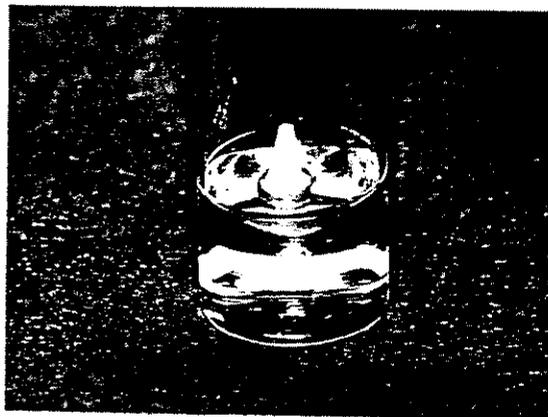
hipoclorito de sodio 8% durante 20 minutos, seguido de tres lavados de 5 minutos cada uno en agua estéril. En condiciones asépticas se redujo el explante hasta 5mm de longitud y de diámetro. Previo a la siembra los explantes se colocaron durante 10 minutos en una solución de ácido ascórbico al 10% con el fin de reducir la producción de fenoles en el explante.

Los explantes se cultivaron en tubos de vidrio de 11x2.5 cm. que contenían alicuotas de 10 ml de un medio de iniciación Murashige y Skoog (1962), suplementado con 1 mg /l de 6-benzilaminopurina (Anexo 25). El pH del medio se ajustó a 5.7 y la esterilización se realizó en un autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1,05Kg/cm² durante 15 minutos.

La fase de iniciación duró aproximadamente 30 días. Después de este periodo los explantes se transfirieron en frascos gerber que contenían alicuotas de 25 ml un medio de multiplicación (Anexo 25), para favorecer la formación de brotes. Esta fase duró aproximadamente entre 45 a 60 días. Finalmente los brotes individuales fueron inoculados durante 30 días en un medio de desarrollo en tubos de vidrio de 12x2.5 cm. que contenían alicuotas de 10 ml del medio de desarrollo (Anexo 25), para favorecer el enraizamiento y desarrollo de las vitroplantas que fueron utilizadas para la investigación.



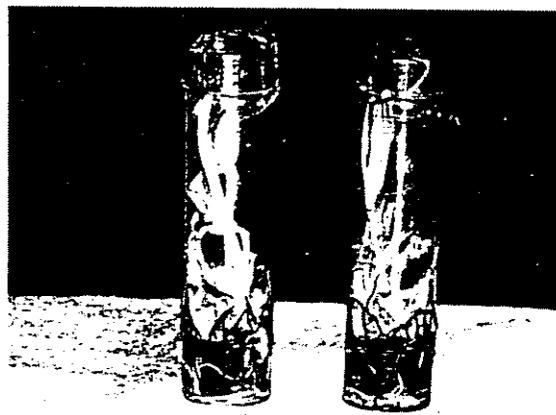
HIJUELO DE CAMPO



FASE DE INICIACION



FASE DE MULTIPLICACION



FASE DE DESARROLLO



FASE DE INVERNADERO

Fig. 2. Esquema general de las fases que comprende la micropropagación en *Musa*.

Durante las tres fases de cultivo los explantes fueron incubados a 27 °C, 70% de humedad relativa y un fotoperiodo de 16/8. Como fuente de luz se utilizaron lamparas fluoresecentes tipo luz de día que emiten una iluminación de 3000 lux.

3.3 Experimentos para la conservación de germoplasma in vitro

Para los tres ensayos de conservación de germoplasma se trató de conservar las vitroplantas durante 6 meses. Antes de sembrar las plántulas se eliminaron las hojas, raíces y parte de las vainas hasta obtener explantes de 1 Cm. El material fue almacenado en una incubadora a 15 °C, y una intensidad de luz 1500 lux a nivel de los cultivos, y un fotoperiodo de 12/12. Las plantas utilizadas en los tres ensayos de conservación tenían aproximadamente 120 días de cultivo. Transcurridos los 6 meses de almacenamiento, las plantúlas se sembraron en un medio clásico de crecimiento(M.S.), para determinar el porcentaje de sobrevivencia bajo condiciones normales de crecimiento(temperatura 27 °C, fotoperiodo 16/8 y una iluminación de 3000 lux).

3.3.1 Efecto de diferentes niveles de sacarosa

El medio básico de conservación utilizado fue el Murashige y Skoog (1962), con los macronutrientes reducidos a la mitad, más 2 g/l de Gelrite como agente gelificante. Los tratamientos se conservaron a 15 °C:

T1= medio básico + 5g/l de sacarosa

T2= medio básico + 10g/l de sacarosa
 T3= medio básico + 15g/l de sacarosa
 T4= medio básico + 20g/l de sacarosa
 T5= medio básico + 30g/l de sacarosa
 T6= medio básico + 30g/l de sacarosa a 27 °C (Testigo absoluto)

Se utilizarón 20 repeticiones para los 2 cultivares 'Gran Enano' y 'Currare'.

3.3.2. Efecto de manitol como osmorregulador

El medio básico fue el descrito en el punto 3.3.1. más una concentración de manitol 0.2M. Los tratamientos se conservaron a 15°C:

T1= medio básico + 5g/l de sacarosa + 0.2M manitol
 T2= medio básico + 10g/l de sacarosa + 0.2M manitol
 T3= medio básico + 15g/l de sacarosa + 0.2M manitol
 T4= medio básico + 20g/l de sacarosa + 0.2M manitol
 T5= medio básico + 30g/l de sacarosa + 0.2M manitol
 T6= medio básico + 30g/l de sacarosa + 0.0M manitol
 T7= medio básico + 30g/l de sacarosa +0.0M manitol a 27°C (testigo absoluto).

Se utilizarón 20 repeticiones para los 2 cultivares 'Gran Enano' y 'Currare'.

3.3.3 Efecto del Acido 2,3,5 triiodobenzioco (TIBA), como inhibidor de crecimiento

El medio básico fue el descrito en el punto 3.3.1., más 30 g/l de sacarosa y 2 g/l de gelrite. Los tratamientos fueron conservados a 15 °C

T1= medio básico + 5mg/l de TIBA

T2= medio básico + 10 mg/l de TIBA

T3= medio básico + 20 mg/l de TIBA

T4= medio básico + 40 mg/l de TIBA

T5= medio básico + 00mg/l de TIBA

T6= medio básico + 00mg/l de TIBA a 27 °C (Testigo absoluto)

3.4 Pruebas de sobrevivencia

Finalizado el período de almacenamiento (6 meses), los cultivos fueron transferidos a un medio de cultivo fresco, sin las sustancias inhibidoras de crecimiento y se mantuvieron en condiciones normales de crecimiento durante un mes. Se consideró como explantes sobreviviente a aquellos que desarrollaron una planta completa, y aquellos que aunque presentaban tejido clorótico- necrótico, emitieron raíces y tuvieron follaje verde despues de los 30 días de sobrevivencia.

3.5 Pruebas de peso fresco y peso seco

Finalizados los 6 meses de almacenamiento se tomarón muestras al azar de 5 plantas por cada tratamiento, con el propósito de

medir la relación entre el peso fresco y peso seco, para conocer el crecimiento neto expresado en términos de peso seco entre los diferentes tratamientos .

El peso fresco se midió en una balanza analítica. Mientras que para determinar el peso seco las muestras fueron colocadas en un horno de desecación a una temperatura de 70 °C, durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las muestras se dejaron enfriar y se les tomó el peso seco en una balanza analítica.

3.6 Variables evaluadas mensualmente durante el almacenamiento

3.6.1 Altura de la plántula:

La altura de la planta se tomó a partir del cuello formado entre el cormo y el seudotallo, hasta, el punto de unión entre las dos últimas hojas completas. Cuando existió una sola hoja la parte terminal se consideró hasta la base de la hoja (peciolo). La medición se hizo con la ayuda de papel milimétrico.

3.6.2 Número de hojas desarrolladas:

Se consideró como hoja desarrollada aquella que presentó un desarrollo completo de la lámina foliar. El recuento se hizo a simple inspección en cada tubo.

3.6.3 Número de raíces:

Se consideró como raíz completa aquella que tuvo una longitud mayor o igual a 1 cm. El recuento se hizo a simple inspección.

3.6.4 : Color y aspecto de la planta:

Se evaluó visualmente, clasificando cada plantas como: normal (verde), clorótica y necrótica.

3.7 Análisis de los datos

Para la variable altura en los tres ensayos de conservación (sacarosa, manitol y TIBA), se utilizó un diseño completamente al azar en parcelas divididas en el tiempo.

Para las variables número de raíces y número de hojas se realizaron pruebas de Chi cuadrado para cada lectura. Para el ensayo de TIBA no se realizaron las pruebas debido a que la producción de hojas y raíces fue inhibida casi en su totalidad.

Para la variable cualitativa relacionada con la coloración de las plantas se establecieron 3 categorías: verdes, cloróticas y necróticas. Se registraron las frecuencias de cada categoría en cada tratamiento.

3.8 Estudio de plantas variantes in vitro

Los dos variantes (gigante y enano), fueron comparados en las plantas testigos en los siguientes estudios:

3.8.1 Recuento de estomas

Se tomarón 10 plantas al azar de cada variante. De cada planta se extrajo una hoja de la que se tomó un segmento de 1cm² de la lámina. Los segmentos de hoja fueron colocados en una solución de Hidróxido de Sodio al 5%, durante 2 días con el propósito de eliminar los pigmentos de la lámina que permitiera realizar el recuento . Luego se transfirieron en una caja Petri en una solución de alcohol al 70 %. Posteriormente fueron observados y contabilizados los estomas en un microscopio a una resolución de aumento de 25X.

A cada segmento de hoja se le hicieron 10 conteos al azar en el haz y envés, se sacó la media correspondiente y ese dato constituyó una repetición.

3.8.2 Determinación de el largo y el ancho de los estomas

Al igual que para el recuento de los estomas se tomaron 10 plantas de cada variante como muestra y con la ayuda de un micrómetro ocular se midio el ancho y largo de los estomas en unidades oculares que multiplicadas por el factor de corrección

(15.83) se obtuvo la medida en (μm). La medición se realizó en un objetivo 25X. Se considero el ancho de los estomas a la parte del centro, y al largo como la longitud existente entre los dos vértices formados por la unión de las dos células oclusivas. La medición se realizó en el haz y envés de la hoja.

A cada segmento de hoja se le hicieron 10 mediciones al azar en el haz y envés, se sacó la media correspondiente y ese dato constituyó una repetición.

3.8.3 Determinación de la tasa de multiplicación

De cada variante se tomaron 20 plantas y fueron transferida a vasos gerber que contenian 25 ml de medio de multiplicación (Anexo 25). Las plantas fueron decapitadas para favorecer la formación de brotes laterales. La tasa de multiplicación fue evaluada visualmente contando los brotes laterales formados en cada planta. La medición fue realizada a los 45 días después de la siembra de los explantes.

3.8.4 Estudios histológicos

Se realizaron estudios histológicos de la lámina y vaina foliar en plantas en crecimiento. La muestra fue de 10 plantas de cada variante. El protocolo seguido se describe a continuación:

En plantas en crecimiento se tomaron segmentos de 3 mm de ancho y 3 mm de largo de lámina de la hoja y de la vaina foliar. Estos segmentos fueron fijados en FAA, durante 48 horas. Posteriormente las muestras fueron deshidratadas progresivamente en una serie ascendente de etanol (50,70,80,90,90,100 %), una hora en cada alcohol. y Finalmente fueron infiltradas en parafina Paraplast Plus. También se prepararon muestras en resina, que fueron fijadas en glutaraldehído al 2.5%.

Una vez infiltrados los segmentos de lámina y de vaina en parafina se hicieron cortes a un grosor de 8 micras en un micrótopo manual de rotación. Las muestras en resina fueron cortadas a un grosor de 2.5 micras en un ultramicrotopo Sorvall MT1 en la Unidad de Microscopía electrónica de la Universidad de Costa Rica. Los cortes en parafina se tiñeron en una coloración cuadruple: Safranina, violeta, cristal, verde rápido FCF, y orange. Los cortes en resina fueron teñidos en azul de toluidina.

3.9 Estudio de plantas variantes a nivel de invernadero

3.9.1 Recuento de estomas

Se tomaron 10 plantas de cada variante y se hizo el recuento de estomas en el haz y envés. La metodología usada fue la misma que la descrita anteriormente para el recuento de estomas en plantas punto 3.8.1.

3.9.2. Determinación de el largo y el ancho de los estomas

Se tomaron 10 plantas de cada variante y se hizo el recuento de estomas en el haz y envés. La metodología usada fue la misma que la descrita anteriormente para el recuento de estomas en plantas punto 3.8.2.

3.9.3 Estudio de cariotipo de los variantes

Se tomaron las puntas de las raíces de 10 plantas por variante, se colocaron en una solución de 8- hydroxiquinolina al 0.002M, durante 4 horas a temperatura ambiente. Luego se lavaron las raíces y se colocaron en una solución fijadora compuesta por 3/4 partes de ácido acético 1/4 de alcohol absoluto. Las muestras se dejaron durante una noche en un refrigerador a una temperatura de 5 °C. Finalmente se les eliminó la solución fijadora y se depositaron en alcohol al 70%, se sellaron y fueron llevadas al Center de Cooperation Internationale en Recherche Agronomique pour le Developpement (CIRAD), para el análisis del cariotipo.

3.9.4 Determinación de la altura de las plantas variantes

Se sembraron 25 plantas de cada variante en bolsas de polietilino de 2Kg y se transfirieron al invernadero, en donde se les tomó la altura mensualmente, durante 3 meses. La altura se midió desde la base de la planta hasta el punto de intersección de

el último par de hojas. La medición se hizo con reglas calibrada en centímetros.

3.9.5 Identificación de algunas características fenotípicas

Durante 3 meses se tomaron medidas mensuales en 25 plantas de cada variante de las siguientes características:

Longitud y ancho del limbo de la hoja: la longitud de la lámina se midió desde la parte terminal del peciolo hasta el ápice de la hoja. El ancho se midió en la parte central de la hoja, justo donde se apreciaba la mayor anchura. La medición se hizo con reglas graduadas en centímetros.

Largo del peciolo: la medición se hizo desde la unión del peciolo con la vaina hasta la unión de del peciolo con la lámina de la hoja.

Diámetro de el seudotallo: la medición se hizo con un Vernier graduado en mm. El diámetro se midió a los 3 cm de altura de la planta.

Número de hojas: se realizó visualmente en cada planta. También se contabilizaron las hojas cloróticas.

El ángulo de inserción de las hojas en el tallo se realizó con un transportador, tomando como punto de origen el centro del seudotallo.

3.9.6 Estudios histológicos

Para las plantas en crecimiento en la fase de invernadero se realizaron estudios histológicos en la lámina y vaina foliar. La metodología utilizada fue la misma que se describió para plantas in vitro, en el punto 3.8.4.

3.10 Análisis de los datos

Para los recuentos de estomas (in vitro y de invernadero) y para la tasa de multiplicación se realizaron análisis de varianza.

Para el recuento de cromosomas se calculó el promedios del número de cromosomas por variante y se sacaron porcentajes de células aneuploides.

Para la variable altura se utilizó un diseño completamente al azar en parcelas divididas en el tiempo. De igual forma, se analizaron las variables morfológicas (diámetro, longitud y ancho de la hoja, índice foliar y número de hojas).

Para el estudio histológico se realizaron análisis descriptivos, comparando mediante fotografías microscópicas la estructura, distribución y forma de las capas de células en los tejidos que forman la lámina y vaina foliar de las plantas in vitro e invernadero.

4. RESULTADOS

4.1. Experimentos de conservación de germoplasma in vitro

Para conservar el germoplasma de 'Currare' y 'Gran Enano' se utilizaron tres ensayos: sacarosa, manitol y ácido triiodobenzoico. Donde se evaluó el crecimiento de las plantas en: altura, formación de hojas y formación de raíces. A continuación se presentan los resultados por cada variable.

4.1.1. Altura

Para el efecto de sacarosa sobre la altura de la plantas. El análisis de varianza detectó diferencias altamente significativas ($P=0.0001$), para cultivares, tratamientos, lecturas, y todas las interacciones (Anexo 1.). La altura fue ascendente en los tratamientos 5 a 20 g/l de sacarosa. Teniendo un descenso en 30 g/l en ambos cultivares (Cuadro 1. Fig.3.). Es de hacer notar que el testigo absoluto a 27 °C presentó la mayor altura en ambos cultivares (Fig.4), aunque solamente fue evaluado en 3 meses, debido a que el recipiente que los contenía no permitió realizar las mediciones posteriores.

Para el efecto de manitol sobre la altura se registró alta significancia ($P=0.0001$) en tratamientos lecturas, y la triple interacción cultivar*tratamiento*lectura, lo que sugiere que la altura estuvo influenciada por acción conjunta de los tres factores. Pero no fue significativa para cultivares ($P=0.141$) ni

para las interacciones cultivar*lectura y cultivar*tratamiento (Anexo 2.). La tendencia de la altura fue ascendente de 5 a 10 g/l de sacarosa + 0.2M manitol (Cuadro 2.; Fig 5.). El testigo absoluto a 27°C presentó la mayor altura que todos los tratamientos.

El análisis de varianza para el efecto de TIBA detectó diferencias significativas para cultivares, tratamientos y lecturas. Sin embargo, no fue significativa para la triple interacción cultivar*tratamiento*lectura ni para cultivar*tratamiento (Anexo 3). La tendencia de la altura disminuyó a medida se aumentaron los niveles de TIBA. Tratamientos de 20 y 40 mg/l fueron perjudiciales para el crecimiento de las plantas (Cuadro 3.; Fig.8.).

Cuadro 1. Altura promedio (Cm) obtenida con diferentes dosis de sacarosa (5,10,15,20,30 g/l), en dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15°C comparado con el testigo absoluto 30g/l sacarosa a 27 °C (TA)

Tiempo (meses)	Cultivar	Tratamientos (Sacarosa g/l)					
		5	10	15	20	30	TA*
	'Currare'						
1		1.21	1.20	1.22	1.34	1.18	2.01
2		1.26	1.37	1.33	1.44	1.21	3.01
3		1.40	1.43	1.45	1.58	1.25	4.19
4		1.43	1.51	1.52	1.73	1.26	
5		1.50	1.58	1.55	1.86	1.29	
6		1.56	1.67	1.67	1.99	1.34	
	'Gran Enano'						
1		1.62	1.74	1.70	1.79	1.68	2.33
2		1.81	1.95	1.89	1.97	1.78	3.55
3		1.89	2.05	2.02	2.11	1.84	5.02
4		1.93	2.11	2.08	2.17	1.88	
5		1.96	2.14	2.12	2.26	1.91	
6		2.11	2.21	2.20	2.33	1.97	

* El TA, solamente fue medido en los primeros 3 meses, porque el recipiente que lo contenía no permitió realizar más mediciones y tuvo que ser transferido a otro medio de cultivo

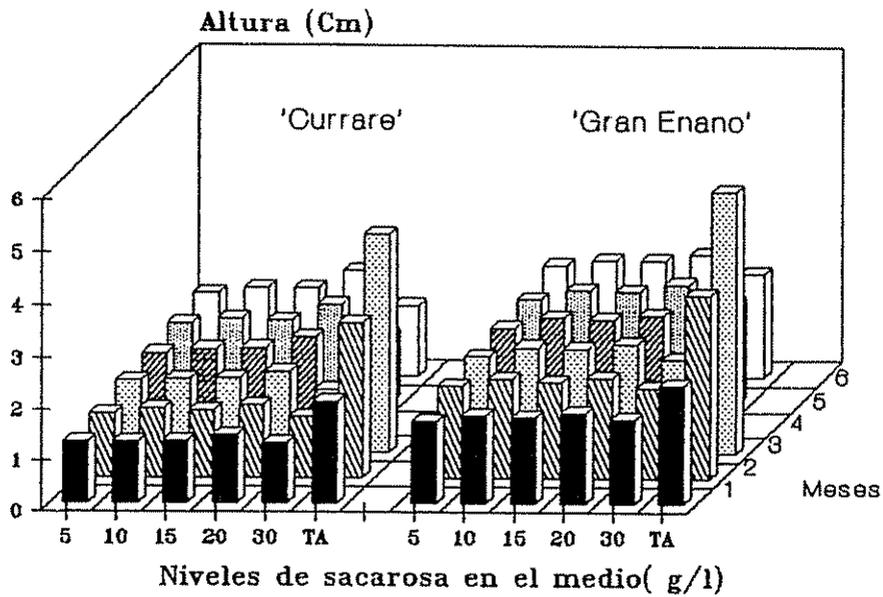


Fig. 3. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la altura (cm) de dos cultivares de *Musa*, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA)

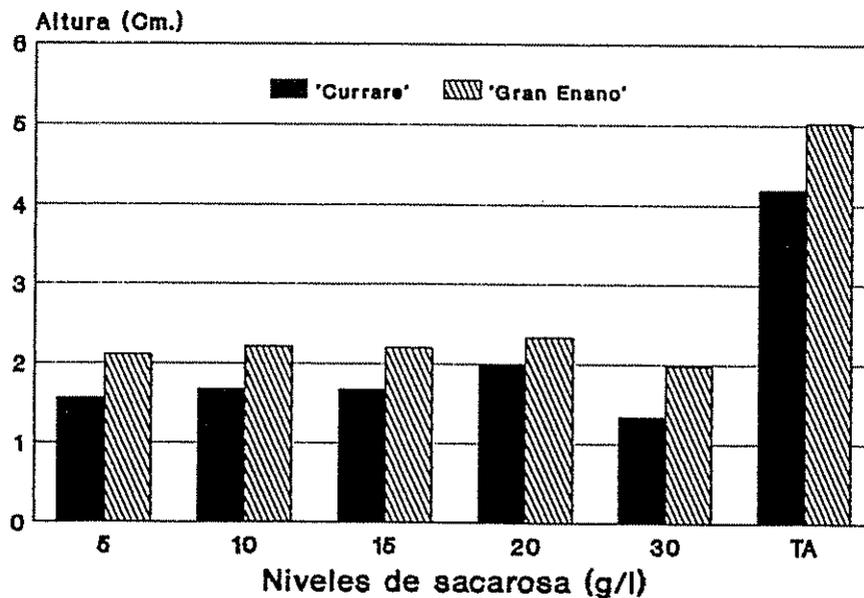


Fig. 4. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la altura (Cm) de dos cultivares de *Musa* al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA)

Cuadro 2. Altura promedio (Cm) obtenida en presencia de manitol a una concentración de 0.2M evaluado en 5 niveles de sacarosa (5,10,15,20,30 g/l), en dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15 °C, comparado con testigo absoluto 30g/l sacarosa a 27°C (TA)

Tiempo (meses)	Cultivar	Trat. (Sac.g/l +0.2M manitol)					T30*	TA*
		5	10	15	20	30		
	'Currare'							
1		1.30	1.44	1.21	1.19	1.14	1.56	2.01
2		1.34	1.47	1.28	1.22	1.16	1.66	3.01
3		1.38	1.52	1.29	1.29	1.22	1.76	4.19
4		1.42	1.62	1.38	1.37	1.25	1.87	
5		1.49	1.71	1.43	1.41	1.25	1.94	
6		1.55	1.78	1.46	1.45	1.25	1.97	
	'Gran enano'							
1		1.22	1.39	1.14	1.15	1.12	1.46	2.33
2		1.26	1.49	1.31	1.20	1.12	1.66	3.55
3		1.33	1.57	1.33	1.21	1.15	1.74	5.02
4		1.37	1.62	1.35	1.22	1.16	1.84	
5		1.40	1.67	1.37	1.24	1.17	2.04	
6		1.44	1.69	1.39	1.26	1.18	2.32	

* El TA, solamente fue medido en los primeros 3 meses, porque el recipiente que lo contenía no permitió realizar más mediciones y tuvo que ser transferido a otro medio de cultivo

*T30= Tratamiento 30 g/l de sacarosa sin manitol

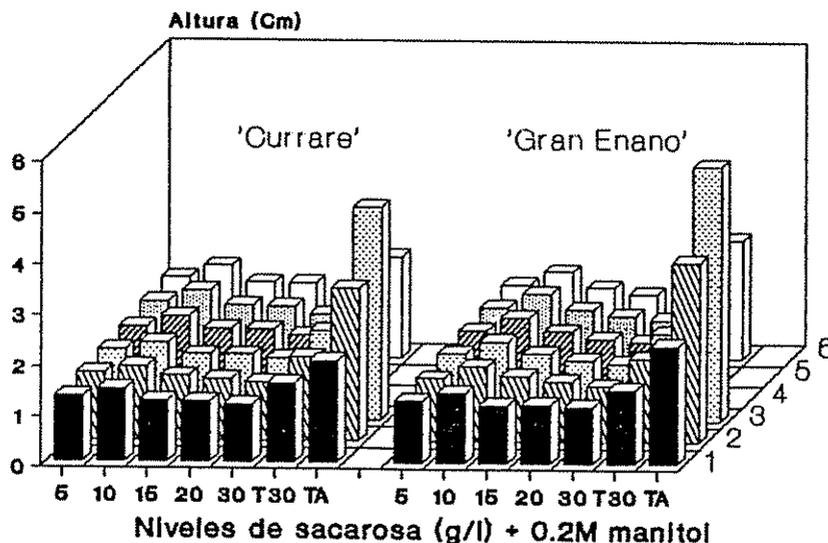


Fig. 5. Efecto del manitol a 0.2M en la altura (Cm) de dos cultivares de *Musa*, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) evaluado durante 3 meses (TA)

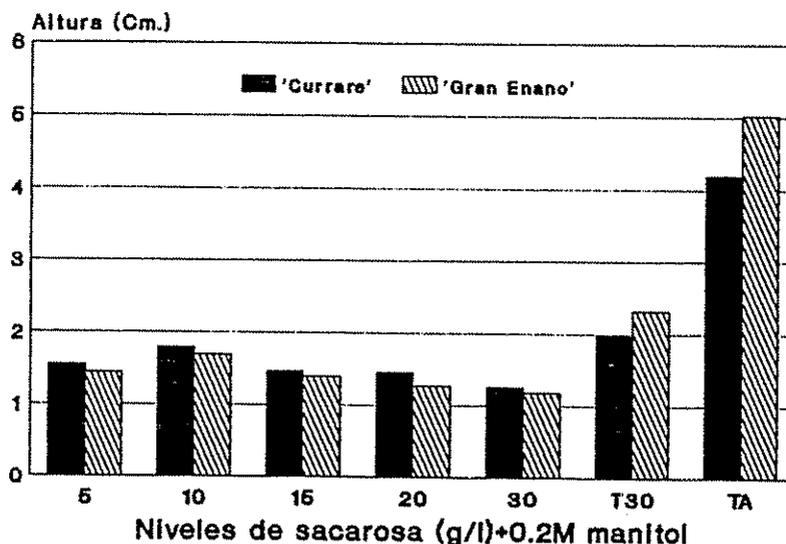


Fig. 6. Efecto del manitol a 0.2M en la altura (Cm) de dos cultivares de *Musa* al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA)

Cuadro 3. Altura promedio (Cm) debido al efecto de TIBA en dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15 °C comparados con el testigo absoluto 30 g/l de sacarosa a 27°C (TA)

Tiempo (meses)	Cultivar	Tratamientos (mg/l TIBA)					TA*
		00	5	10	20	40	
	'Currare'						
1		1.42	1.26	1.11	1.09	1.02	2.01
2		1.58	1.38	1.16	1.12	1.02	3.01
3		1.64	1.44	1.23	1.14	1.02	4.19
4		1.77	1.54	1.27	1.18	1.04	
5		1.93	1.69	1.35	1.23	1.06	
6		2.12	1.86	1.43	1.29	1.08	
	'Gran Enano'						
1		1.33	1.05	1.10	1.07	1.01	2.33
2		1.56	1.35	1.12	1.09	1.01	3.55
3		1.62	1.36	1.19	1.10	1.02	5.02
4		1.68	1.38	1.23	1.11	1.03	
5		1.77	1.42	1.28	1.11	1.06	
6		1.90	1.50	1.31	1.13	1.07	

* El TA, solamente fue medido en los primeros 3 meses, porque el recipiente que lo contenía no permitió realizar más mediciones y tuvo que ser transferido a otro medio de cultivo

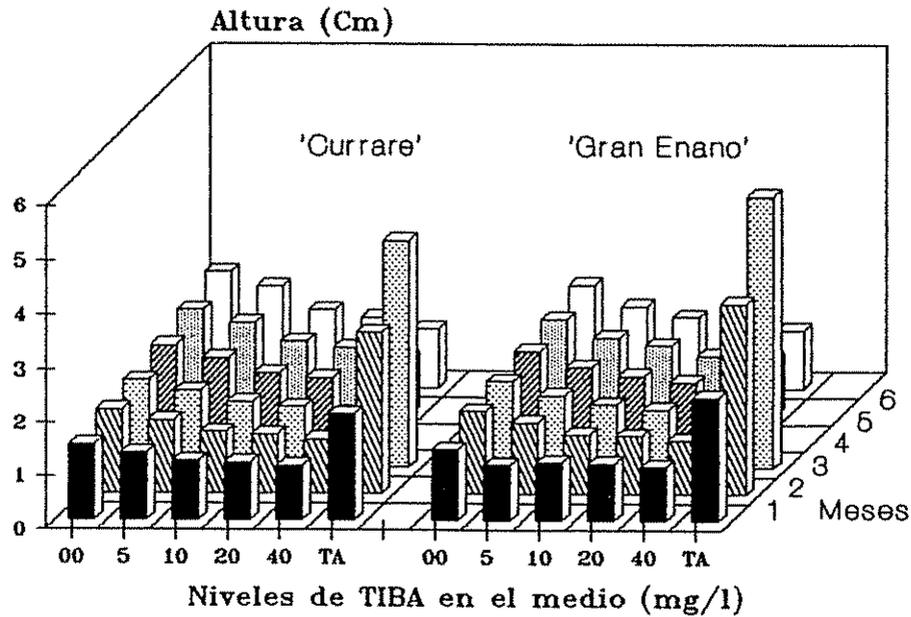


Fig 7. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la altura (Cm) de dos cultivares de *Musa*, durante 6 meses de almacenamiento a 15 °C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA)

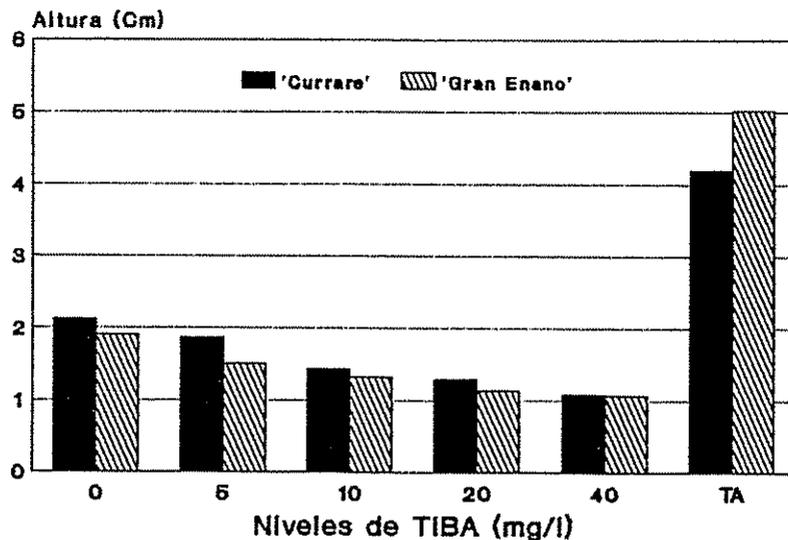


Fig. 8. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la altura (Cm) de dos cultivares de *Musa*, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA)

4.1.2. Número de hojas

El Cuadro 4. presenta el número promedio de hojas desarrolladas en presencia de sacarosa a través de 6 lecturas mensuales. Las pruebas de Chi cuadrado registraron significancia para tratamientos, cultivar y la interacción tratamiento*cultivar durante 6 meses de lectura (Anexo 4.). La tendencia de la formación de hojas fue similar a la altura, siendo ascendente de 5 a 20 g/l de sacarosa y tuvo su mínimo en el 30 g/l . El descenso fue más brusco en 'Currare' que 'gran Enano'. En todos los tratamientos el testigo absoluto presentó el mayor número de hojas desarrolladas.(Fig.9.y 10.).

El Cuadro 5. presenta los promedios para la producción de hojas de 'Currare' y 'Gran Enano' en presencia de 0.2M de manitol. La formación de hojas fue ascendente de 5 a 10 g/l sacarosa + 0.2M de manitol. En ambos cultivares el tratamiento que presentó menor formación de hojas fue 30 g/l de sacarosa + 0.2M manitol (Fig. 11 y 12.).

Las pruebas de Chi cuadrado (Anexo 5.),demostraron que hubo significancia estadística entre tratamientos y cultivares. La interacción Cultivar*tratamiento no fue significativa en los 3 últimos meses, indicando que la formación de hojas en los últimos 3 meses fue mínima (Cuadro 5.).

El cuadro 6. muestra los promedios de formación de hojas en diferentes concentraciones de TIBA. La producción de hojas descendió a medida que las concentraciones de TIBA aumentaron. Tratamientos de 20 y 40 mg/l inhibieron la formación de hojas durante las 6 lecturas. Mientras el testigo absoluto a 3 meses de almacenamiento presento la mayor tasa de formación de hojas (Fig.13 y 14.).

Cuadro 4. Número promedio de hojas producidas a diferentes concentraciones de sacarosa en dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30 g/l de sacarosa a 27 °C (TA)

Tiempo (meses)	Cultivar	Tratamientos (Sac. g/l)					
		5	10	15	20	30	TA*
	'Currare'						
1		1.65	1.65	1.65	2.10	0.60	3.65
2		2.10	1.95	2.25	2.45	1.00	4.80
3		2.25	2.15	2.55	2.85	1.20	4.95
4		2.70	2.85	3.00	3.25	1.44	
5		3.00	3.00	3.30	3.40	1.45	
6		3.00	3.00	3.35	3.40	1.55	
	'Gran Enano'						
1		1.20	1.37	1.45	1.35	1.60	3.00
2		1.70	1.74	1.80	1.75	1.85	4.60
3		2.15	2.32	2.40	2.30	2.21	4.70
4		2.70	3.11	2.85	2.75	2.74	
5		2.95	3.47	3.20	3.10	2.74	
6		3.25	3.47	3.25	3.20	2.74	

* El TA, solamente fue medido en los primeros 3 meses, porque el recipiente que lo contenía no permitió realizar más mediciones y tuvo que ser transferido a otro medio de cultivo

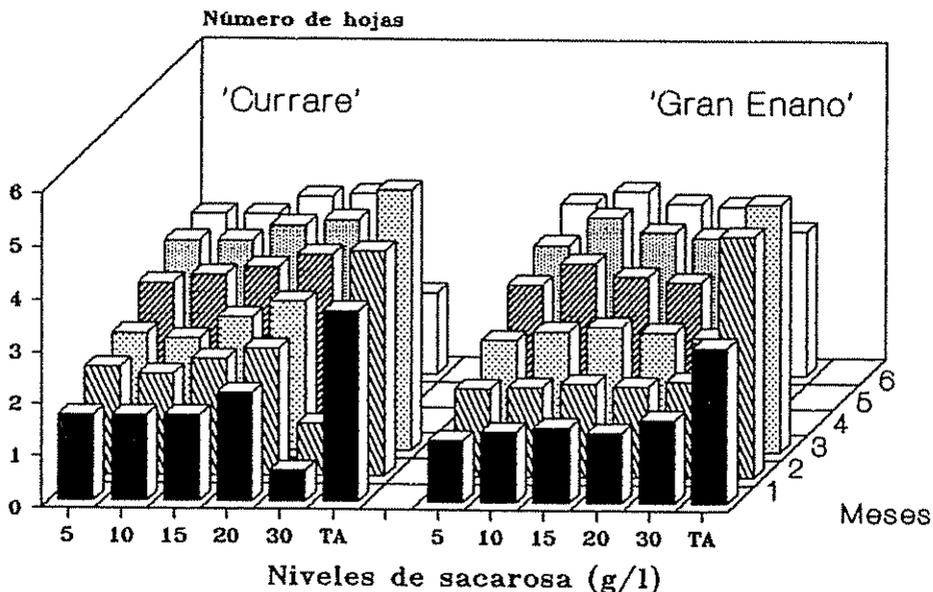


Fig. 9. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la formación de hojas de dos cultivares de *Musa*, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA)

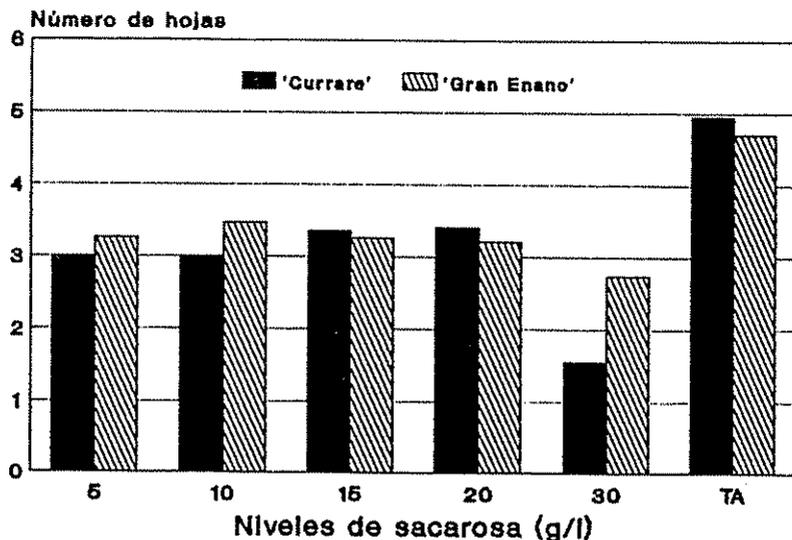


Fig. 10. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la formación de hojas de dos cultivares de *Musa*, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA)

Cuadro 5. Número promedio de hojas producidas a una concentración de 0.2M de manitol en diferentes concentraciones de sacarosa en dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30g/l de sacarosa a 27 °C (TA)

Tiempo (meses)	Tratamiento(g/l sac.+ 0.2M manitol)						
	5	10	15	20	30	T30*	TA*
'Currare'							
1	0.40	0.55	0.25	0.16	0.15	1.45	3.65
2	0.50	1.05	0.60	0.58	0.25	1.50	4.80
3	0.50	1.30	0.60	0.68	0.35	1.90	4.95
4	0.70	1.30	0.80	0.74	0.40	1.90	
5	0.85	1.50	0.85	0.84	0.55	1.95	
6	0.85	1.55	0.85	0.89	0.55	2.05	
'Gran enano'							
1	0.30	0.37	0.25	0.15	0.15	0.75	3.00
2	0.35	0.44	0.50	0.35	0.30	1.10	4.60
3	0.55	0.63	0.60	0.45	0.35	1.35	4.70
4	0.55	0.63	0.65	0.45	0.35	1.35	
5	0.55	0.68	0.65	0.45	0.35	1.50	
6	0.55	0.68	0.65	0.45	0.35	1.70	

* El TA, solamente fue medido en los primeros 3 meses, porque el recipiente que lo contenía no permitió realizar más mediciones y tuvo que ser transferido a otro medio de cultivo

* T30= Tratamiento 30 g /l de sacarosa sin manitol

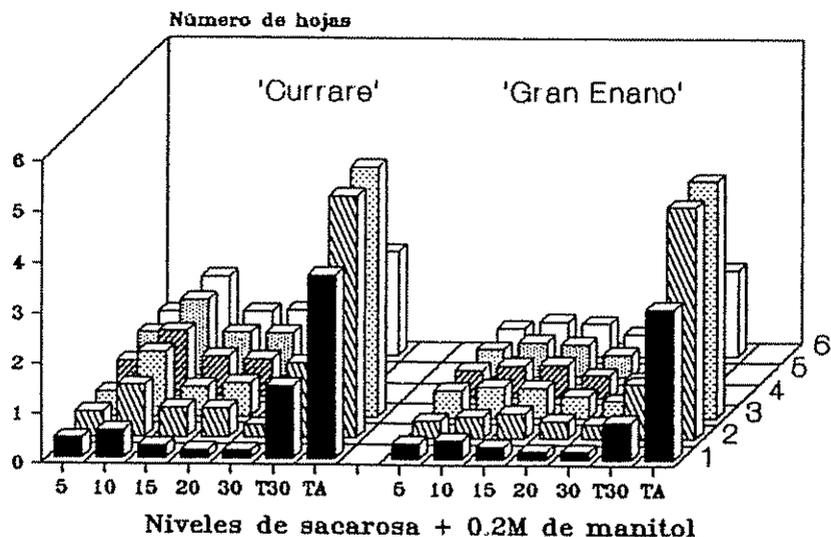


Fig. 11. Efecto del manitol a 0.2M en la formación de hojas de dos cultivares de *Musa*, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30) y el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) evaluado durante 3 meses (TA)

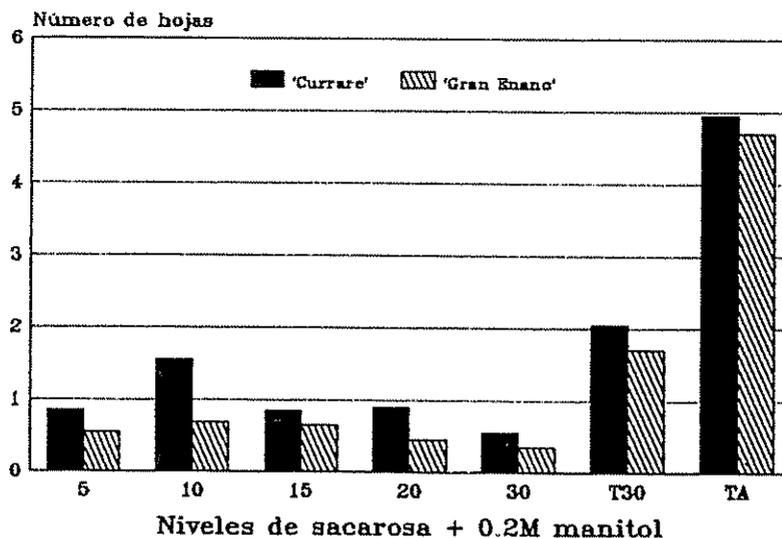


Fig. 12. Efecto del manitol a 0.2M en la formación de hojas de dos cultivares de *Musa* al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA)

Cuadro 6. Número promedio de hojas producidas a diferentes concentraciones de TIBA en dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15 °C, comparado con el testigo absoluto 30g/l de sacarosa a 27 °C (TA)

Tiempo (meses)	Cultivar	Tratamientos (mg/l TIBA)					TA*
		00	5	10	20	40	
	'Currare'						
1		0.90	0.75	0.35	0.20	0.00	3.65
2		1.10	0.90	0.45	0.40	0.05	4.80
3		1.20	1.10	0.50	0.55	0.05	4.95
4		1.45	1.35	0.50	0.55	0.05	
5		1.65	1.85	0.75	0.75	0.15	
6		1.90	2.25	0.80	0.80	0.15	
	'Gran Enano'						
1		0.65	0.40	0.45	0.20	0.10	3.00
2		0.95	0.55	0.70	0.20	0.15	4.60
3		1.20	0.65	0.90	0.35	0.20	4.70
4		1.25	0.75	1.05	0.40	0.20	
5		1.40	0.95	1.25	0.40	0.25	
6		1.55	1.35	1.40	0.45	0.30	

* El TA, solamente fue medido en los primeros 3 meses, porque el recipiente que lo contenía no permitió realizar más mediciones y tuvo que ser transferido a otro medio de cultivo

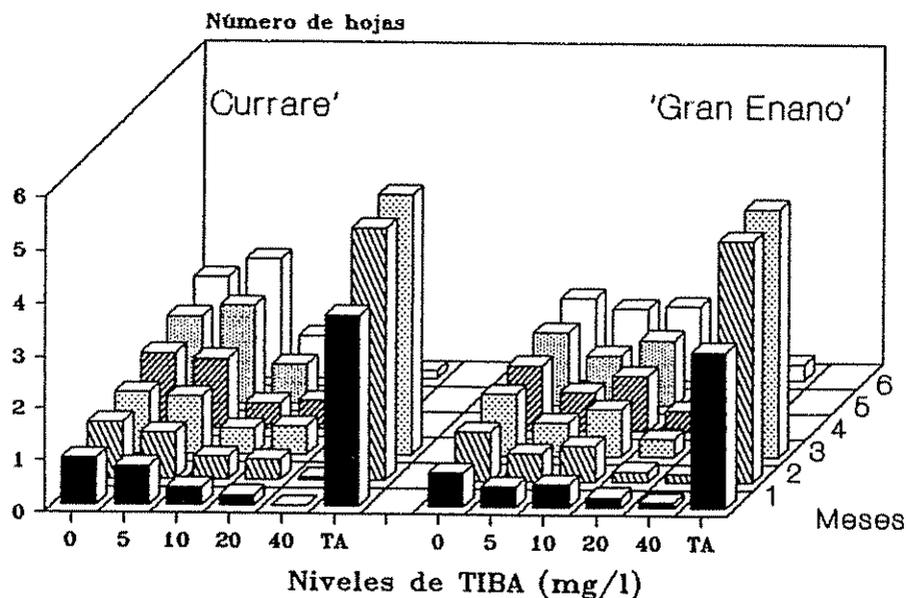


Fig. 13. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la formación de hojas en dos cultivares de *Musa* durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA)

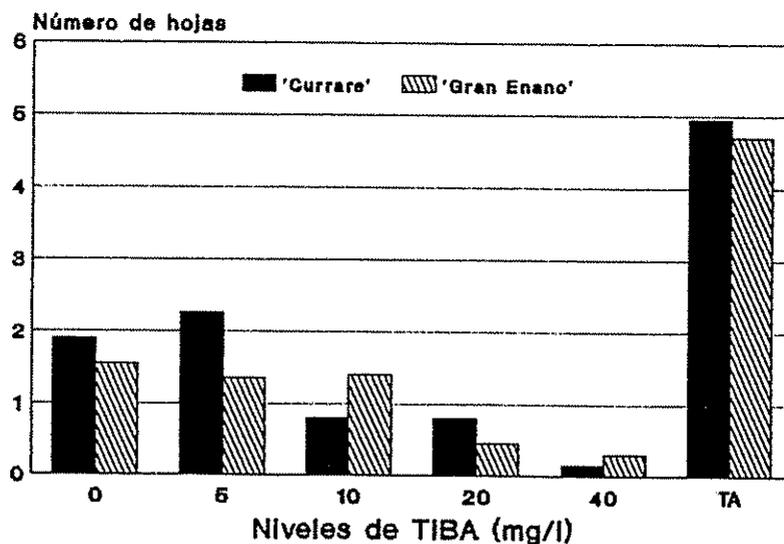


Fig. 14. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la formación de hojas de dos cultivares de *Musa*, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 3 meses (TA)

4.1.3 Número de raíces

La producción de raíces en los diferentes niveles de sacarosa presentó una tendencia ascendente de 5 a 10 g/l. El tratamiento 30 g/l tuvo la menor tasa de formación de raíces (Fig. 15. y 16.). Las pruebas de Chi cuadrado (Anexo 4.) detectaron que existen diferencias significativas entre los tratamientos y cultivares durante los 6 meses de almacenamiento. Pero la interacción cultivar*tratamiento no fue significativa en los 4 últimos meses, indicando que hubo poca formación de raíces (Cuadro 7.).

El Cuadro 8. muestra la formación de raíces debido al efecto de manitol. En ambos cultivares la respuesta fue variable no presento una tendencia definida. Los tratamientos 5 y 30 g/l de sacarosa + 0.2M manitol fueron los que más disminuyeron la tasa de formación de raíces. El testigo absoluto presentó la mayor producción de raíces (Fig. 17. y 18.).

Las pruebas de Chi cuadrado demuestran que existen diferencias entre los tratamientos; pero no entre cultivares, ya que sólo en la primera lectura fue significativa (Anexo 5.)

El cuadro 9 presenta el número promedio de raíces producidas a diferentes concentraciones de TIBA. La formación de raíces disminuyó a medida que se aumentaron las concentraciones de ácido triiodobenzoico. Niveles de TIBA superiores a 10 mg/l inhibieron drásticamente el desarrollo de las raíces, principalmente en 'Gran Enano' que 'Curre' (Fig.19 y 20).

Cuadro 7. Número promedio de raíces producidas a diferentes concentraciones de sacarosa en dos cultivares de *Musa*, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30 g/l de sacarosa a 27 °C (TA)

Tiempo (meses)	Cultivar	Tratamientos (Sac. g/l)					TA*
		5	10	15	20	30	
	'Currare'						
1		0.95	0.80	0.80	1.00	0.10	4.15
2		1.25	1.40	1.35	1.20	0.30	NC*
3		1.30	1.80	1.60	1.25	0.50	NC
4		1.45	2.30	1.90	1.65	0.60	
5		1.60	2.40	2.15	1.95	0.65	
6		1.70	2.40	2.20	2.00	0.65	
	'Gran Enano'						
1		0.90	1.84	0.80	1.50	0.90	4.20
2		1.20	2.58	1.70	2.30	1.85	NC
3		2.30	3.47	2.40	2.60	2.00	NC
4		2.30	3.68	2.40	2.60	2.11	
5		2.35	3.68	2.45	2.60	2.11	
6		2.50	3.84	2.45	2.60	2.11	

*TA= El testigo absoluto sólo se midió en el primer mes

*NC=Las raíces no se podían contabilizar por el alto número y por el enrollamiento de las mismas.

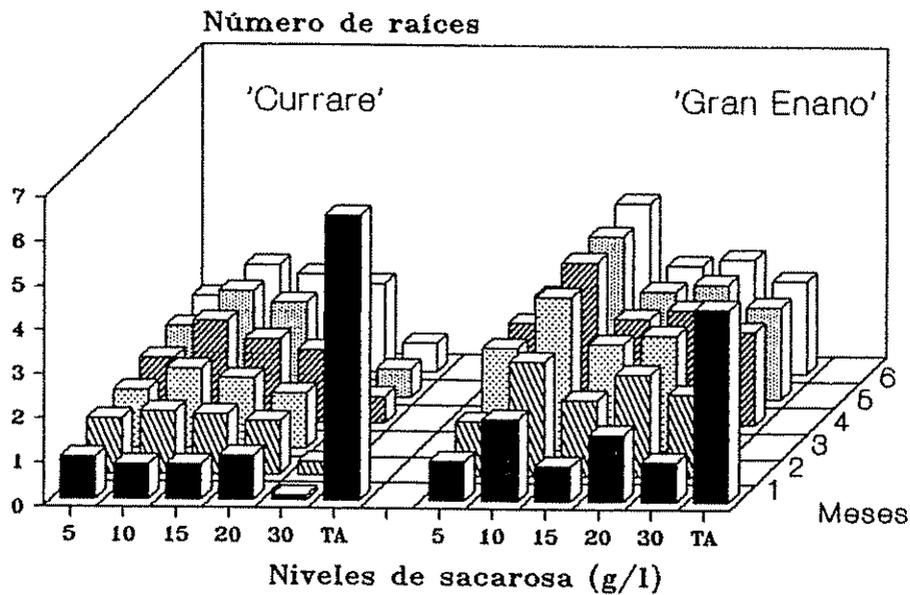


Fig. 15. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la formación de raíces de dos cultivares de *Musa*, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA)

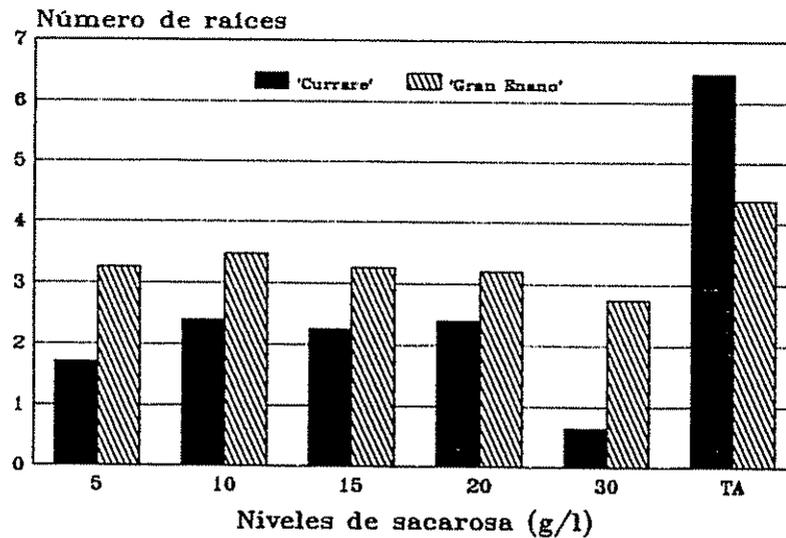


Fig. 16. Efecto de diferentes concentraciones de sacarosa en la formación de raíces de dos cultivares de *Musa*, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA)

Cuadro B. Número promedio de raíces producidas en presencia de 0.2M de manitol en diferentes concentraciones de sacarosa, en dos cultivares de Musa, durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30 g/l de sacarosa a 27°C (TA)

Tiempo (meses)	Cultivar	Tratamientos(g/l sac.+0.2M manitol)						
		5	10	15	20	30	T30*	TA*
	'Currare'							
1		0.30	0.20	0.55	0.32	0.55	1.00	4.15
2		0.55	0.35	0.95	0.63	0.65	1.20	NC**
3		0.80	0.50	0.95	1.16	1.00	1.60	NC
4		0.80	0.50	0.95	1.21	1.30	1.60	
5		0.80	0.50	0.95	1.42	1.30	1.60	
6		0.80	0.60	1.10	1.54	1.30	1.60	
	'Gran Enano'							
1		0.55	0.95	0.50	1.05	0.50	1.25	4.20
2		0.65	1.06	0.50	1.05	0.65	1.45	NC
3		0.65	1.16	0.55	1.05	0.65	1.75	NC
4		0.85	1.37	0.60	1.05	0.65	1.75	
5		0.85	1.47	0.60	1.05	0.70	1.90	
6		0.85	1.47	0.65	1.05	0.70	2.20	

*TA= El testigo absoluto sólo se midió en el primer mes

**NC=Las raíces no se podían contabilizar por el alto número y por el enrollamiento de las mismas.

* T30= Tratamiento 30 g /l de sacarosa sin manitol

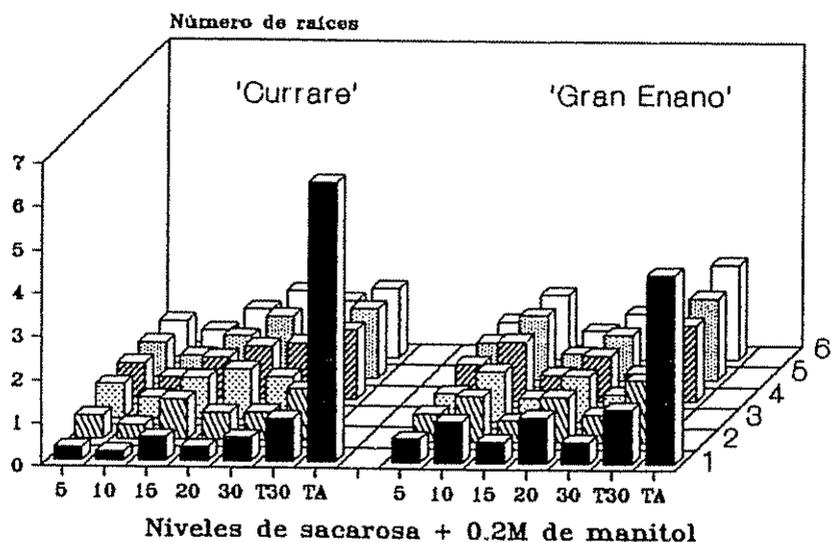


Fig.17. Efecto del manitol a 0.2M en la formación de raíces en dos cultivares de *Musa* durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA)

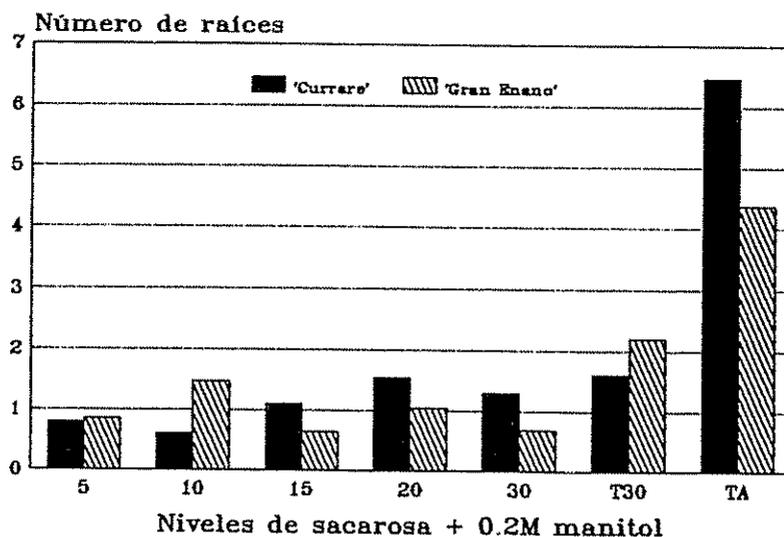


Fig. 18. Efecto del manitol a 0.2M en la formación de raíces de dos cultivares de *Musa*, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con 30 g/l de sacarosa (T30) y con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA)

Cuadro 9. Número promedio de raíces producidas en presencia de diferentes concentraciones de TIBA, en dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto 30g/l de sacarosa a 27°C (TA)

Tiempo (meses)	Cultivar	Tratamientos (mg/l TIBA)					TA*
		0	5	10	20	40	
	'Currare'						
1		0.90	0.30	0.00	0.10	0.00	4.15
2		1.35	0.55	0.05	0.30	0.00	NC*
3		1.40	0.90	0.05	0.30	0.00	NC
4		1.55	1.30	0.05	0.30	0.00	
5		1.70	1.35	0.25	0.30	0.10	
6		1.85	1.45	0.25	0.30	0.10	
	'Gran Enano'						
1		0.60	0.00	0.10	0.00	0.00	4.20
2		0.70	0.15	0.15	0.05	0.00	NC
3		0.90	0.25	0.15	0.05	0.00	NC
4		0.90	0.25	0.15	0.05	0.00	
5		1.00	0.30	0.20	0.05	0.00	
6		1.05	0.35	0.20	0.05	0.00	

*TA= El testigo absoluto sólo se midió en el primer mes

** NC=Las raíces no se podían contabilizar por el alto número y por el enrollamiento de las mismas.

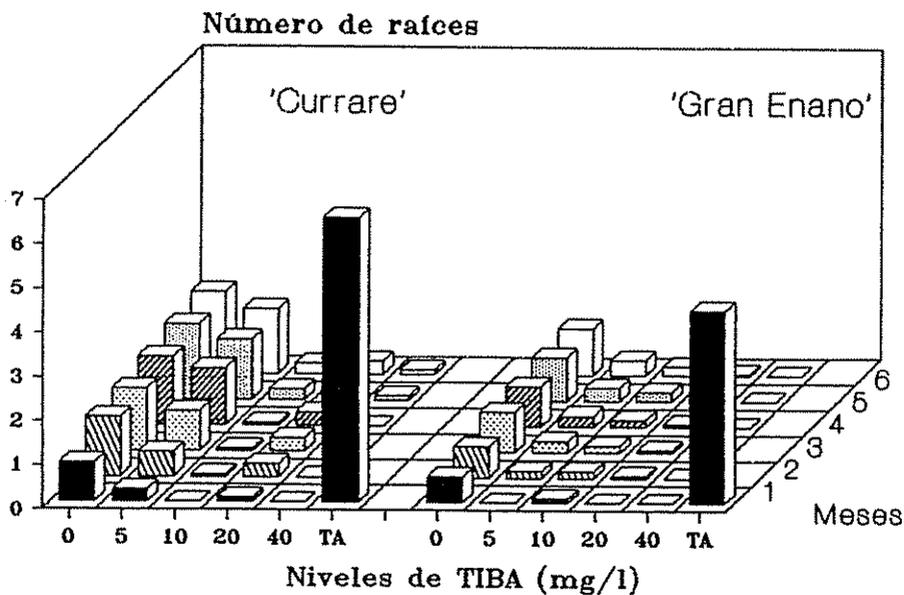


Fig. 19. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la formación de raíces en dos cultivares de *Musa* durante 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA)

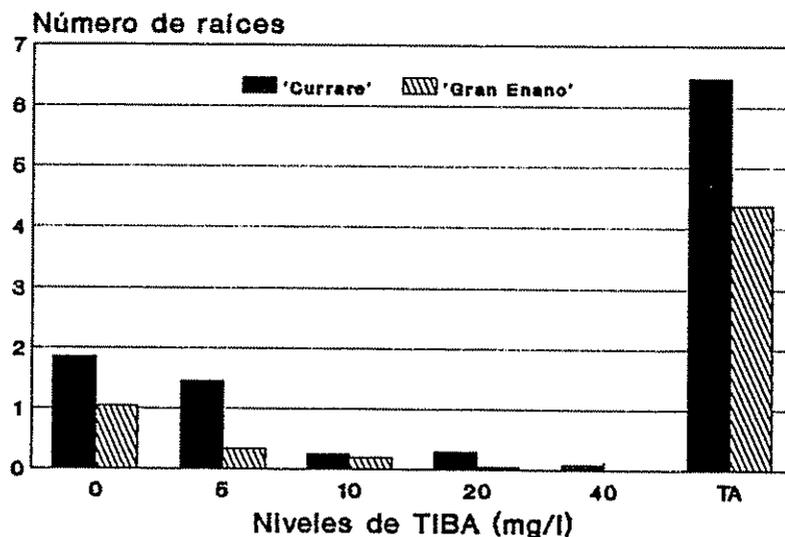


Fig. 20. Efecto de diferentes concentraciones de TIBA en la formación de raíces de dos cultivares de *Musa*, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C, comparado con el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C) a 1 mes (TA)

4.1.4 Coloración de las plantas

4.1.4.1. Efecto niveles de sacarosa

La coloración y aspecto general de las plantas en los diferentes niveles de sacarosa fue normal, predominando la coloración verde. Los únicos tratamientos donde se presentaron plantas cloróticas fueron 5 y 30 g/l de sacarosa. Sin embargo, el cultivar 'Gran Enano' presentó mayores porcentajes de plantas cloróticas. Por otra parte, no se presentaron plantas necróticas (Fig.21A.; Anexo 6.).

4.1.4.2. Efecto de manitol(0.2M)

La presencia de manitol en los mismos niveles de sacarosa aumento la presencia de plantas cloróticas y necróticas. A medida que las concentraciones de sacarosa aumentaron tambien se incrementó el porcentaje de plantas cloróticas y necróticas. En los tratamientos 20 y 30 g/l de sacarosa + 0.2M de manitol, el porcentaje de plantas cloróticas y necróticas fue superior a las verdes. Por otra parte, los porcentajes de plantas con coloraciones anormales fueron superiores en 'Gran Enano' que 'Currare'. En ambos cultivares el testigo 30 g/l sacarosa 0.0M manitol no presentó plantas anormales (Fig.21B.; Anexo 7.).

4.1.4.3 Efecto de niveles de ácido triiodobenzoico

Concentraciones superiores a 10 mg/l de TIBA fueron completamente perjudiciales para el desarrollo normal de las plantas, en ambos cultivares. En el tratamiento de 40 mg/l el 90% de las plantas presentaron coloraciones anormales. Con un Predominio de plantas necróticas. Al igual que en los dos ensayos anteriores (sacarosa y manitol) el cultivar 'Curre' presentó mayor tolerancia a la acción del inhibidor (Fig.21C.; Anexo 8.).

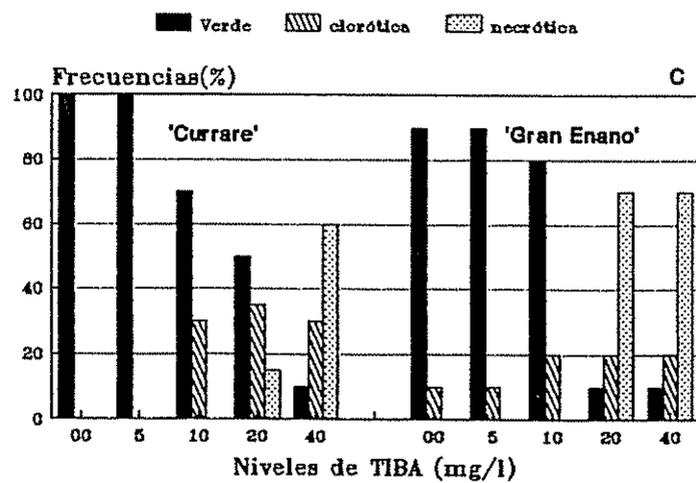
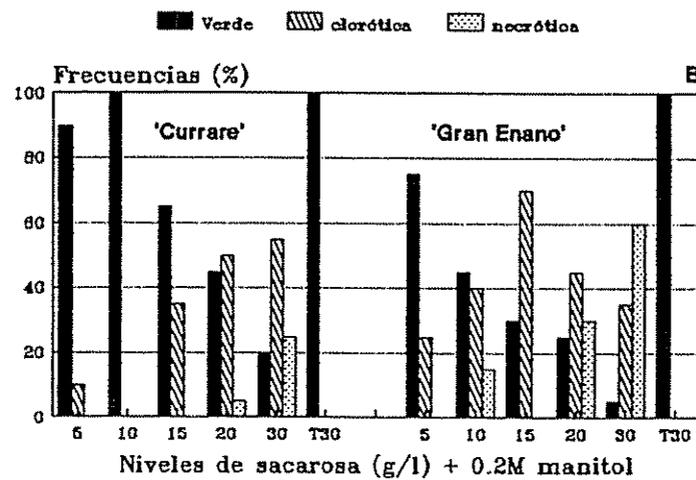
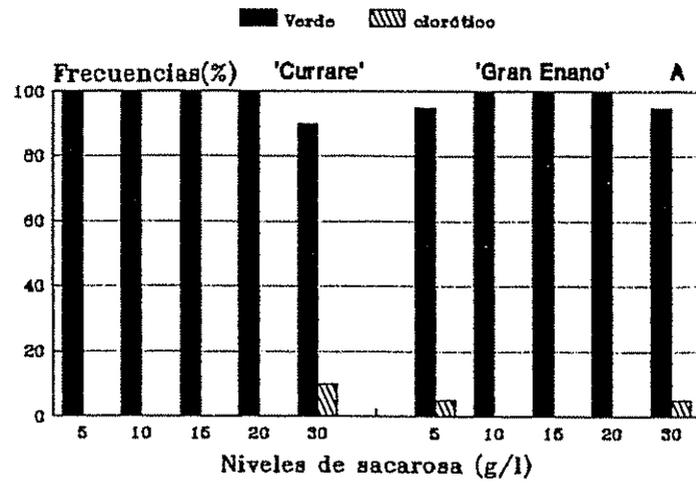


Fig. 21. porcentajes para la coloración de las plantas debido al efecto de la sacarosa(A), manitol(B) y del TIBA(C), en dos cultivares de *Musa* al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C

4.1.5 Relación entre peso fresco y peso seco de las plantas en los diferentes ensayos de conservación

4.1.5.1 Relación entre el peso fresco y peso seco para el ensayo con sacarosa

La relación entre el peso fresco y el peso seco, expresado como la acumulación de materia seca (porcentaje de peso seco), fue ascendente en la medida que se aumentaron las concentraciones de sacarosa en el medio de conservación. El tratamiento con menor acumulación de peso seco fue el 5 g/l de sacarosa y el mayor fue el de 30 g/l de sacarosa en ambos cultivares (Cuadro 10.; Fig. 22A.). Es importante señalar que el crecimiento en la altura de la planta no correspondió a los mayores porcentajes de peso seco de las plantas. Esto puede explicarse, si se considera que las plantas que presentaron mayor altura experimentaron una mayor elongación de sus células, debido a la cantidad de agua que acumularon y no a la cantidad de materia seca.

4.1.5.2. Relación entre el peso fresco y peso seco para el ensayo con Manitol a 0.2M a diferentes concentraciones de sacarosa

El comportamiento de el porcentaje de peso seco también fue ascendente a medida que se aumentaron las concentraciones de sacarosa. Los tratamientos con menor acumulación de materia seca fueron 10 y 5 g/l de sacarosa+0.2M. y el de mayor acumulación fue

20 g/l de sacarosa en 'Currare' y en 'Gran Enano' los tratamientos 5 g/l sacarosa +0.2M y 30 g/l sacarosa +0.0M de manitol presentaron los menores porcentajes de pesos seco (Cuadro 10.; Fig.22B.).

4.1.5.3. Relación entre el peso fresco y peso seco para el ensayo con diferentes niveles de (TIBA)

El porcentaje de peso seco en las diferentes concentraciones de TIBA, no tuvieron una tendencia definida, como en los ensayos de sacarosa y manitol. Los tratamientos con menor acumulación de materia seca fueron 40 mg/l de TIBA en 'Currare' y 5 mg/l de TIBA en 'Gran Enano' (Cuadro 10.; Fig.22C.). Todos los tratamientos contenían 30 g/l de sacarosa, quizá éste hecho explique por que no se presentó una tendencia en la acumulación de materia seca.

Cuadro 10. Pesos frescos, pesos secos(g) y relación entre el peso fresco y peso seco (%PS), de las plantas en presencia de sacarosa, manitol y TIBA, en dos cultivares de *Musa*, al final de 6 meses de almacenamiento a 15 °C

Trat.	'Currare'			'Gran Enano'		
	PF	PS	%PS	PF	PS	%PS
<i>Sacarosa</i>						
5 g/l	0.289	0.019	6.57	0.612	0.033	5.39
10 g/l	0.380	0.025	6.58	0.774	0.047	6.07
15 g/l	0.394	0.028	7.11	0.807	0.051	6.32
20 g/l	0.504	0.039	7.74	0.885	0.066	7.46
30 g/l	0.289	0.030	10.38	0.595	0.053	8.91
<i>Manitol 0.2M</i>						
5 g/l+0.2M	0.180	0.015	8.33	0.205	0.019	9.27
10 g/l+0.2M	0.318	0.025	7.86	0.263	0.031	11.79
15 g/l+0.2M	0.186	0.022	11.82	0.178	0.020	11.23
20 g/l+0.2M	0.176	0.024	13.64	0.152	0.018	11.84
30 g/l+0.2M	0.140	0.019	13.57	0.159	0.019	11.95
30 g/l+—	0.433	0.047	10.85	0.545	0.050	9.17
<i>TIBA</i>						
00 mg/l	0.425	0.039	9.17	0.500	0.043	8.60
5 mg/l	0.245	0.024	9.79	0.220	0.019	8.64
10 mg/l	0.241	0.024	9.96	0.151	0.017	11.26
20 mg/l	0.152	0.014	9.21	0.106	0.011	10.37
40 mg/l	0.104	0.008	7.69	0.077	0.007	9.1

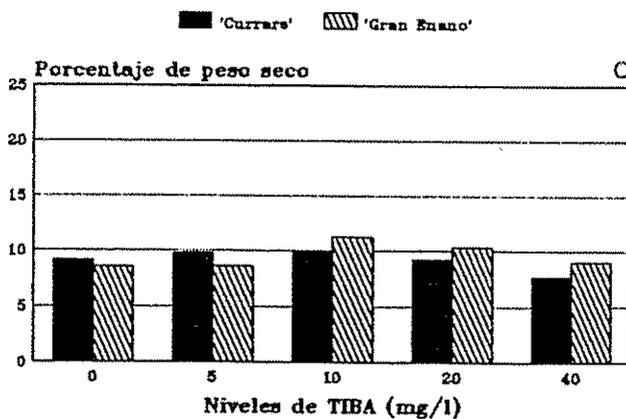
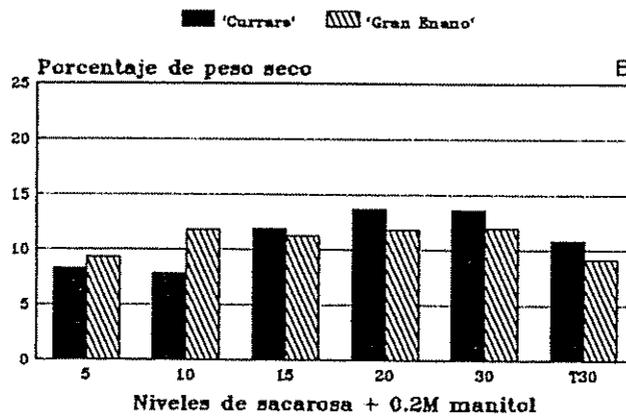
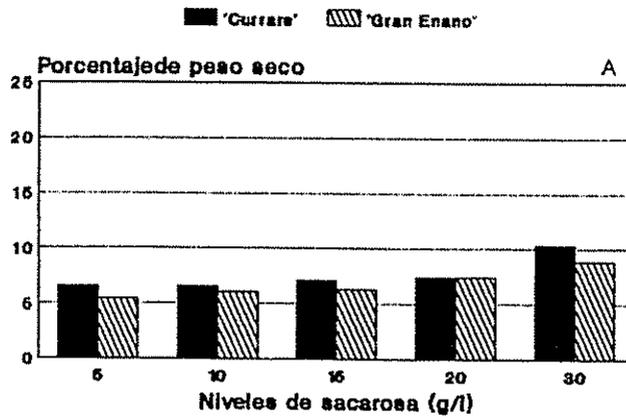


Fig. 22. Porcentajes de peso seco de las plantas debido al efecto de sacarosa(A), manitol(B) y TIBA(C), en dos cultivares de *Musa*, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C.

4.1.6 pruebas de sobrevivencia

4.1.6.1 Pruebas de sobrevivencia debido al efecto de sacarosa

Los porcentajes de sobrevivencia para el ensayo con sacarosa fueron de 100% en todos los tratamientos en ambos cultivares, (Cuadro 11.; Fig.23A.). Durante los 30 días de sobrevivencia la tasa de crecimiento de las plantas aumentó notablemente. La producción de hojas y raíces fue rápida y el aspecto físico de las plantas fue satisfactorio. Aunque las plantas con niveles 30 g/l de sacarosa fueron menos vigorosas que las de los otros tratamientos en ambos cultivares.

4.1.6.2 Pruebas de sobrevivencia debido al efecto de manitol

Los porcentajes de sobrevivencia para el efecto del manitol fueron superiores en todos los tratamientos en el cultivar 'currare' (AAB) que 'Gran Enano' (AAA), excepto el testigo. Por otro lado, el porcentaje de sobrevivencia disminuyó a medida que los niveles de sacarosa aumentaron. Los tratamientos con 5 y 10 g/l sacarosa +0.2M fueron los que presentaron mayores porcentajes de sobrevivencia (Cuadro 11.; Figura.23B.).

La producción de hojas y raíces no fue tan rápida como en las pruebas de sobrevivencia de sacarosa. Sin embargo, el aspecto general de las plantas fue satisfactorio, aunque no tuvieron el vigor ni tasas de crecimiento elevadas.

4.1.6.3 Pruebas de sobrevivencia debido al efecto de TIBA

La sobrevivencia fue superior en 'Currare' (AAB) que en 'Gran Enano'. Los tratamientos con 0 y 5 mg/l de TIBA, fueron los que presentaron mayores porcentajes de sobrevivencia. Por otro lado, la sobrevivencia se redujo notablemente a partir de 20 mg/l de TIBA. En el caso del tratamiento 40mg/l de TIBA, en ambos cultivares el porcentaje de sobrevivencia fue inferior al 50 %. Teniendo un efecto más nocivo en 'Gran Enano' (Cuadro 11. Fig.23C.).

durante la fase de sobrevivencia la producción de hojas y raíces fue más escasa que en las pruebas de sacarosa y manitol. Sin embargo las plantas que lograron sobrevivir presentaron un aspecto normal. Aunque menos vigorosa que las de sacarosa y manitol.

4.1.7. Comparación del incremento experimentado en las variables evaluadas después de 6 meses de almacenamiento a 15°C

El cuadro 12 resume el incremento en altura, número de hojas, número de raíces, porcentaje de peso seco y la sobrevivencia del material almacenado en sacarosa, manitol y TIBA. Para el uso de sacarosa el mejor tratamiento fue el 30 g/l a 15°C, debido a que tuvo el menor incremento en altura y el menor número de hojas y raíces desarrolladas y un porcentaje de sobrevivencia de 100% (Cuadro 12.)

Para el ensayo con manitol a 0.2M, el mejor tratamiento lo constituyó 5 g/l sacarosa +0.2M a 15°C, debido a que a concentraciones mayores de 10 g/l sacarosa +0.2M a 15°, los porcentajes de sobrevivencia fueron muy bajos, especialmente en el cultivar 'Gran Enano' (Cuadro 12.). Es importante observar que

Para el ensayo de diferentes concentraciones de TIBA, el mejor tratamiento lo constituyó 5 mg/l de TIBA a 15°C, debido a que a concentraciones superiores a 10 mg/l de TIBA, los porcentajes de sobrevivencia son bajos, especialmente en el cultivar 'Gran Enano' (Cuadro 12).

Es destacable el hecho, que con cualquier sustancia utilizada en el medio de conservación (sacarosa, manitol y TIBA), los incrementos en altura, número de hojas y número de raíces son bajos en todos los tratamientos; lo cual podría sugerir, que son efectivos para conservar germplasma. Sin embargo, los porcentajes de recuperación fueron bajos en la mayoría de los tratamientos con manitol y TIBA.

Cuadro 11. Pruebas de sobrevivencia para el efecto de sacarosa manitol y ácido triiodobenzóico en dos cultivares de *Musa*, durante 1 mes a 27 °C, después de 6 meses de almacenamiento.

Tratamientos	porcentaje de sobrevivencia	
	'Currare'	'Gran Enano'
<i>Ensayo sacarosa</i>		
5 g/l	100	100
10 g/l	100	100
15 g/l	100	100
20 g/l	100	100
30 g/l	100	100
<i>Ensayo manitol</i>		
5 g/l + 0.2M manitol	100	80
10 g/l + 0.2M manitol	100	66
15 g/l + 0.2M manitol	80	66
20 g/l + 0.2M manitol	74	54
30 g/l + 0.2M manitol	66	54
30 g/l + 0.0M manitol	100	100
<i>Ensayo TIBA</i>		
00 mg/l	100	100
5 mg/l	100	80
10 mg/l	87	73
20 mg/l	67	60
40 mg/l	47	27

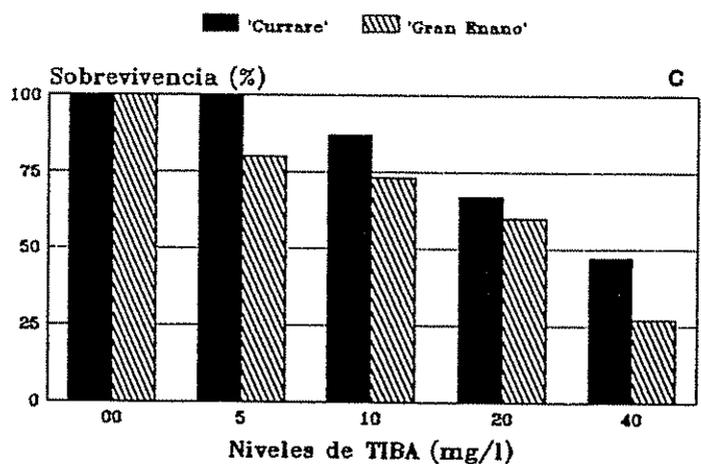
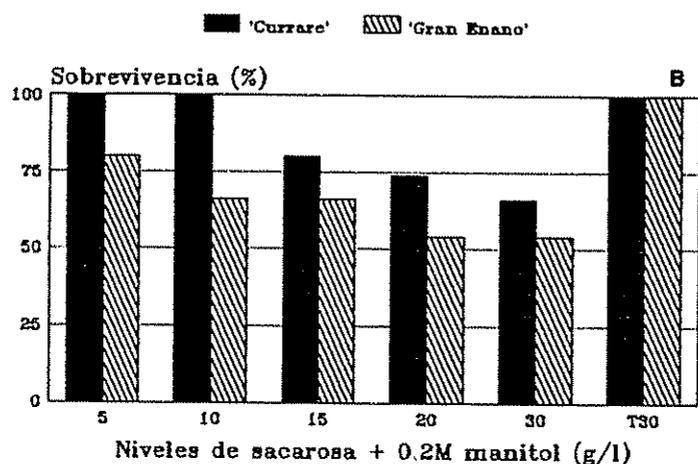
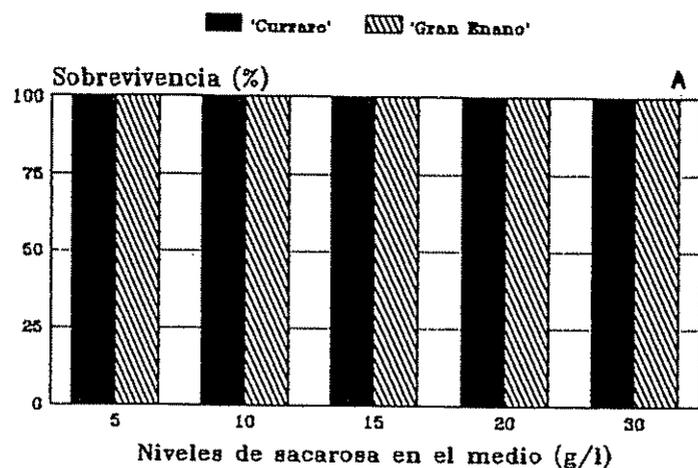


Fig. 23. Porcentajes de sobrevivencia debido al efecto de sacarosa(A), manitol(B) y TIBA(C), en dos cultivares de *Musa*, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C.

Cuadro.12. Incremento de altura, número de hojas, número de raíces relación peso seco peso fresco y porcentaje de sobrevivencia debido al efecto de sacarosa, manitol y TIBA, en dos cultivares de *Musa*, al final de 6 meses de almacenamiento a 15°C

	Altura (Cm)		# hojas		# raíces		% PS		%sobrevivencia	
<i>Sacarosa</i>										
	<i>Cu</i>	<i>G.E.</i>	<i>Cu</i>	<i>G.E.</i>	<i>Cu.</i>	<i>G.E.</i>	<i>Cu.</i>	<i>G.E.</i>	<i>Cu</i>	<i>G.E</i>
5	0.56	1.11	3.00	3.25	1.70	2.50	6.57	5.39	100	100
10	0.67	1.21	3.00	3.47	2.40	3.84	6.58	6.07	100	100
15	0.67	1.20	3.35	3.25	2.20	2.45	7.11	6.32	100	100
20	0.99	1.33	3.40	3.20	2.00	2.60	7.74	7.46	100	100
30	0.34	0.97	1.55	2.74	0.65	2.11	10.38	8.91	100	100
TA*	3.19	4.02	4.95	4.70	6.46	4.37				
<i>Manitol 0.2M</i>										
5	0.55	0.44	0.85	0.55	0.80	0.85	8.33	9.27	100	80
10	0.78	0.69	1.55	0.68	0.60	1.47	7.86	11.79	100	66
15	0.46	0.39	0.85	0.65	1.10	0.65	11.82	11.23	80	66
20	0.45	0.26	0.89	0.45	1.54	1.05	13.64	11.84	74	54
30	0.25	0.18	0.55	0.35	1.30	0.70	13.57	11.95	66	54
0.0M	0.97	1.32	2.05	1.70	1.60	2.20	10.85	9.17	100	100
TA*	3.19	4.02	4.95	4.70	6.46	4.37				
<i>TIBA</i>										
0	1.12	0.90	1.90	1.55	1.85	1.05	9.17	8.60	100	100
5	0.86	0.50	2.25	1.35	1.45	0.35	9.79	8.64	100	80
10	0.43	0.31	0.80	1.40	0.25	0.20	9.96	11.26	87	73
20	0.29	0.13	0.80	0.45	0.30	0.05	9.21	10.37	67	60
40	0.08	0.07	0.15	0.30	0.10	0.00	7.69	9.10	47	27
TA*	3.19	4.02	4.95	4.70	6.46	4.37				

TA* el testigo absoluto (30 g/l de sacarosa a 27°C), la altura y el número de hojas se midió hasta el 3 mes y el número de raíces hasta el 1 mes. (*Cu*='Currare'; *G.E.*='Gran Enano')

4.2 Estudio de variantes a nivel in vitro e invernadero

4.2.1. Estudios histológicos

La Fig. 24. muestra las secciones transversales de la lámina foliar de los variantes y el testigo en dos estados de crecimiento (in vitro e invernadero), la anatomía de la lámina foliar, es la típica de una hoja de monocotiledónea. La estructura y organización interna de los tejidos, tanto en los variantes como en el testigo fueron muy similares. No se registraron diferencias en el número de capas de células por tejido, ni en la localización y organización de los mismos. De manera general internamente la lámina foliar está formada por una epidermis e hipodermis en ambas superficies, parénquima empalizada adaxial, parenquima esponjoso, haces vasculares y células laticífera asociadas al floema.

La epidermis adaxial y abaxial están conformadas por una capa de células pequeñas y alargadas bastante uniformes. Es un tejido glabro, con paredes anticlinales no sinuosas. En ambas epidermis los estomas se organizan en hilera, siendo más numerosos en el envés. Además se observan grandes cámaras subestomáticas, principalmente en el envés. La hipodermis (debajo de la epidermis en ambas superficies), está formada por una capa de células grandes sin color. La forma de las células es variable en ambas superficies.

El mesofilo (parénquima fotosintético) forma una empalizada adaxial compuesta de una capa de células tubulares, que contienen numerosos cloroplastos. El mesofilo abaxial está reemplazado por

canales de aire. El parénquima esponjoso, localizado por debajo del empalizada, está formado por células redondeadas que contienen pocos cloroplastos.

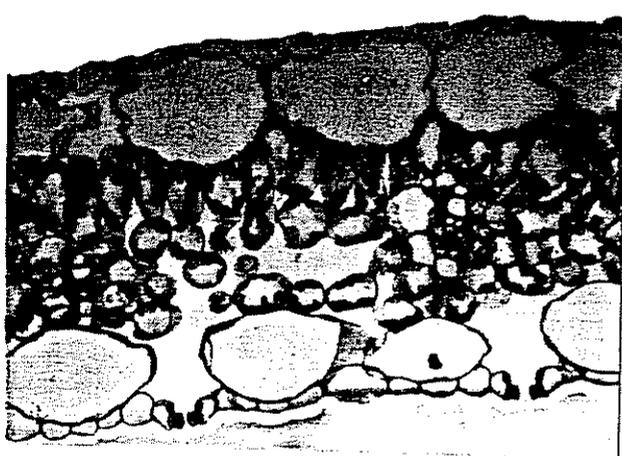
En el haz vascular, el xilema está formado por elementos traqueales y se localiza adaxialmente y el floema está formado por elementos cribosos y se localiza abaxialmente. Hay células laticíferas asociados al floema que contienen mucílago oscuro.

La figura 25. presenta las secciones transversales de la vaina foliar de los variantes y testigo en dos estados de crecimiento (in vitro e invernadero). Al igual que en la lámina foliar la estructura interna de la vaina foliar fue muy similar en los variantes y el testigo. A continuación se describen los tejidos que la conforman.

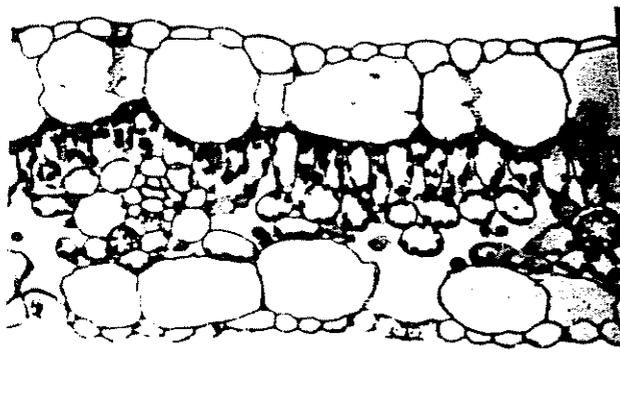
La epidermis de la vaina foliar es glabra en ambas superficies y está compuesta de una capa de células. No se logra diferenciar en ambas superficies la hipodermis. Muy cercana a la epidermis localizada hacia el interior de la vaina, que corresponde a una epidermis adaxial, se observan haces de fibras libriformes.

Adyacente a la epidermis se localizan células parenquimatosas con granúlos de almidón. Estas células difieren en forma y tamaño entre sí. La vaina tiene grandes espacios airíferos que generalmente se localizan en el centro. El xilema se encuentra localizado hacia el interior y el floema al exterior. Asociado al floema hay células laticíferas con alto contenido mucilaginoso.

TESTIGO



ENANO



GIGANTE

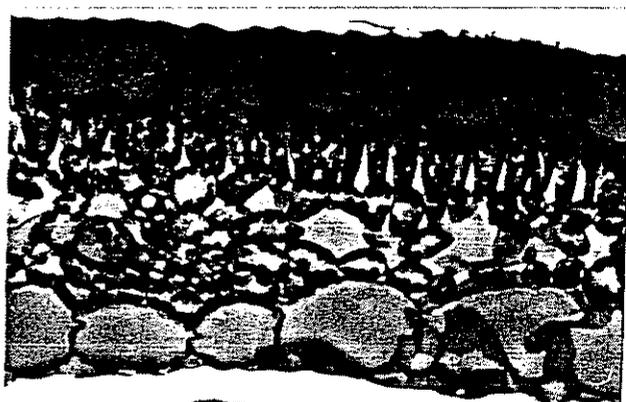
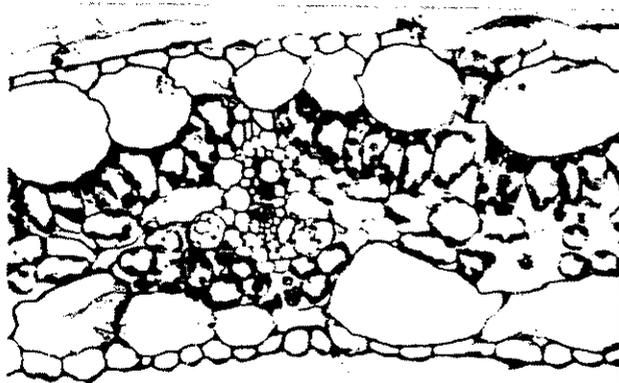
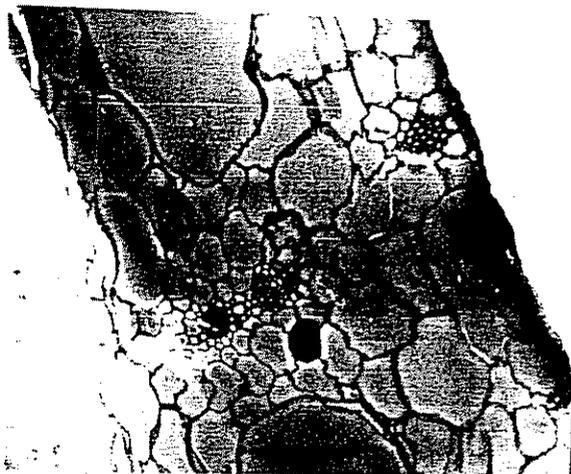
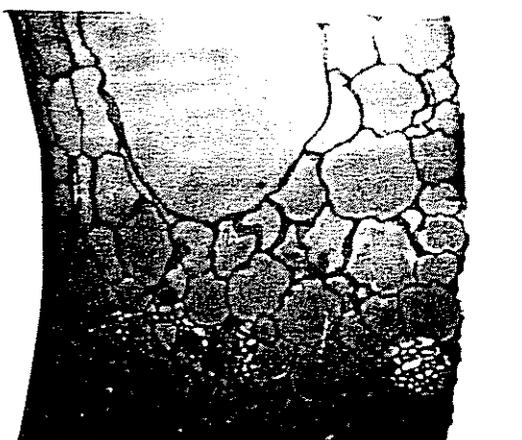


Fig. 24. Secciones transversales de lámina foliar de *Musa* en plantas testigo, enano, y gigante en dos estados de crecimiento (*in vitro* e invernadero), observadas a 10X

TESTIGO



ENANO



GIGANTE

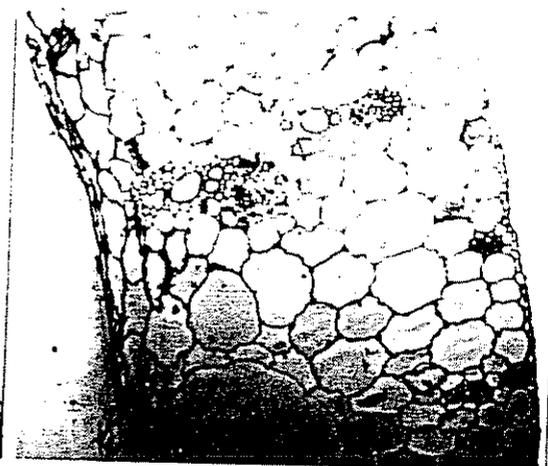
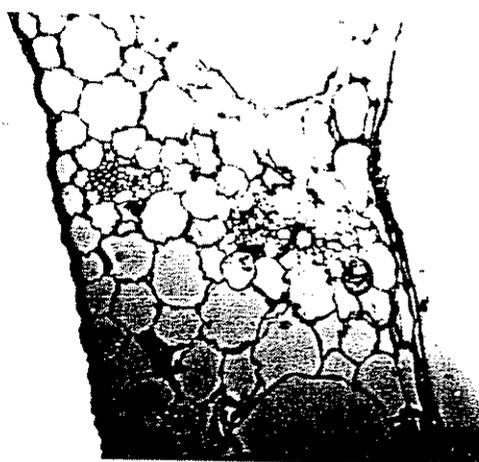


Fig 25. Secciones transversales de vaina foliar de *Musa* en plantas testigo, enano y gigante en dos estados de crecimiento (*in vitro* e invernadero), observadas a 4X.

4.2.2. Recuento de estomas en variantes in vitro e invernaderoCuadro.13 Comparación del número promedio de estomas en plantas variantes de plátano 'Currare' en dos estados de crecimiento (in vitro e invernadero)

Variante	Estado de crecimiento de las plantas			
	In vitro		Invernadero	
	Haz (Estomas/mm ²)	Envés (Estomas/mm ²)	Haz (Estomas/mm ²)	Envés (Estomas/mm ²)
Enano	18.76 ±1.06	56.32 ±4.52	16.92 ±1.47	68.48 ±5.02
Testigo	15.74 ±1.88	64.25 ±4.26	13.88 ±2.76	64.23 ±7.11
Gigante	16.17 ±2.51	57.81 ±5.41	13.67 ±1.53	60.87 ±4.45

El análisis estadístico para el recuento de estomas en variantes in vitro (Anexo 9.). El recuento en el haz no fue significativo ($P=0.1394$) para el análisis del recuento en el envés ($P= 0.1205$), indicando que tampoco existen diferencias en el número de estomas entre los variantes. Por otro lado, la cantidad de estomas siempre fue superior en el envés que en el haz (Cuadro 13.)

El análisis de varianza (Anexo 10.), para el recuento de estomas en invernadero para el haz no fue significativo ($P=0.1138$) indicando que no existen diferencias significativas en el número de estomas . Para el envés ($P=0.2818$), indicando que tampoco existen diferencias entre los variantes. Al igual que en la fase in vitro la cantidad de estomas fue superior en el envés que en el haz (Cuadro 13.).

Cuadro. 14. Comparación de el ancho y largo (μm) de los estomas entre los variantes, en dos estados de crecimiento

Variante	Estado de crecimiento de las plantas							
	In vitro				Invernadero			
	Haz		Envés		Haz		Envés	
	Largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho	largo	ancho
Enano	32.66	23.28	32.61	23.35	34.06	22.94	32.77	22.35
Testigo	33.62	23.76	32.60	22.94	34.08	23.40	33.19	22.59
Gigante	32.91	23.16	32.89	22.78	34.94	22.78	33.62	23.00

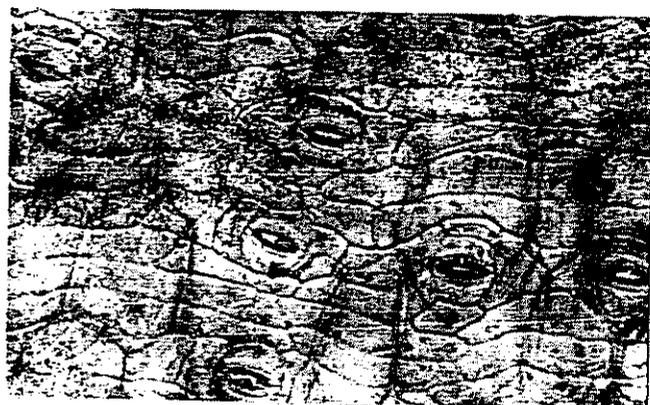
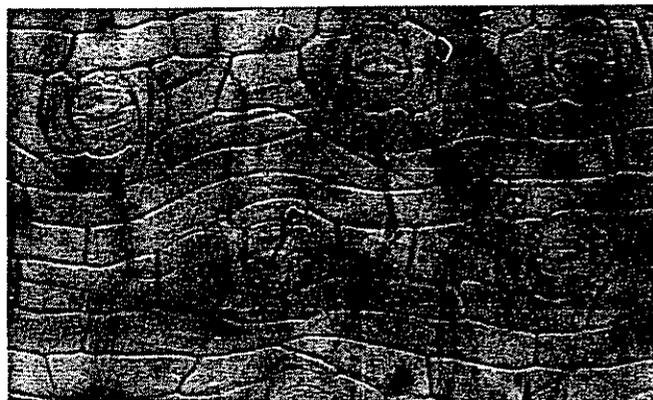
Los análisis de varianza (Anexos 11. y 12.) no registraron diferencias significativas para el ancho y largo de los estomas, tanto el ház y en el envés en condiciones in vitro. Para condiciones de crecimiento en invernadero tampoco se detectaron diferencias estadísticas (Anexos 13. y 14.)

La figura 26. presenta las vistas paradermales de secciones de lámina foliar que ilustran los estomas en los dos variantes y el testigo en dos estados de crecimiento(in vitro e invernadero). Se puede observar que la cantidad de estomas es similar en los variantes y el testigo. En cuanto a el largo y ancho de los estomas son bastante similares tanto in vitro como en invernadero (Cuadro 14.). Sin embargo en la fase in vitro las células epidérmicas y la hipodermis son más grandes que en las plantas de invernadero (Fig.26.).

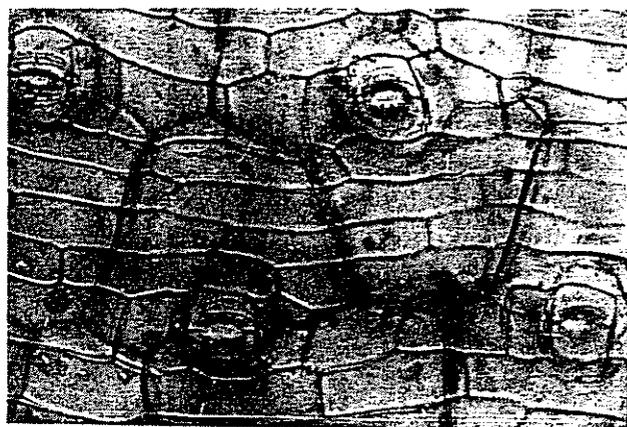
Por otro lado, la presencia de ceras fue mayor en plantas provenientes de invernadero que en las plantas in vitro. Este hecho permite observar con menos claridad los estomas en la fase de invernadero.

En cuanto a la forma de las células subsidiarias de los estomas, éstas fueron muy variable en tamaño y forma dentro y entre los variantes y el testigo. Generalmente, los estomas tienen cuatro células subsidiarias que lo rodean.

TESTIGO



ENANO



GIGANTE

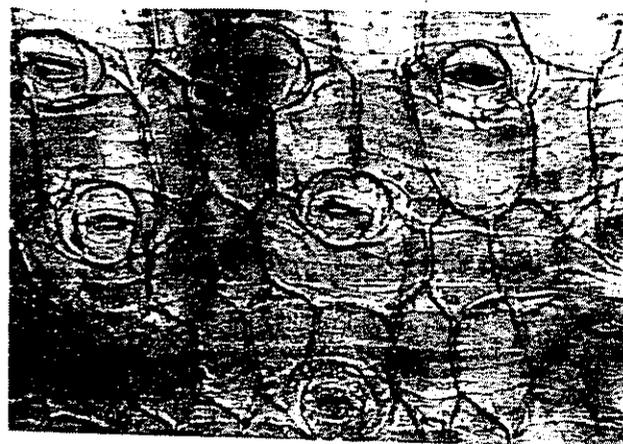
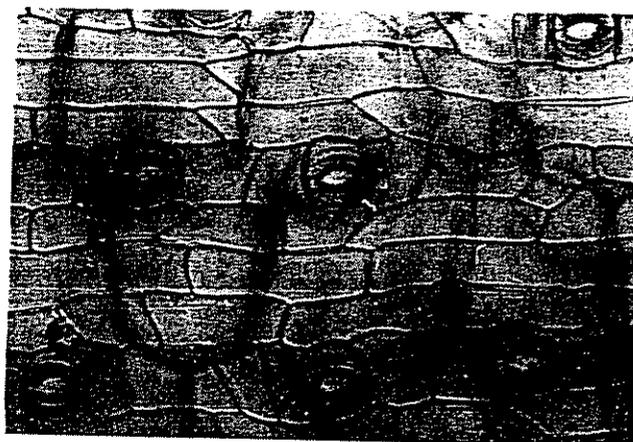


Fig. 26. Vistas paradermales de secciones transversales de lámina foliar de *Musa*, que ilustran los estomas de plantas testigo, enano y gigante a nivel *in vitro* y de invernadero, observadas a 10X.

4.2.3 Análisis del cariotipo de variantes en invernadero

Cuadro 15. Análisis de cariotipo de variantes de 'Currare' comparadas con el testigo en plantas en invernadero

	#plantas (muestra)	#células observadas	células con			% células aneuploides	promedio. #cromosomas
			32	33	34		
Enano	10	16	3	13	0	18.75	32.81
Testigo	10	14	0	13	1	7.14	33.07
Gigante	10	21	3	17	1	19.0	32.90

En general no hay diferencias en el número de cromosomas entre el variante enano=32.81; Testigo=32.07; gigante=32.90. Sin embargo el Cuadro 15. muestra que existieron cambios en el cariotipo, que oscilo entre 32-34. Existiendo mayor porcentaje de células aneuploides en los variantes que en el testigo

4.2.4 Determinación de la tasa de multiplicación

Cuadro 16. Prueba de Duncan para comparar las medias de la tasa de multiplicación entre variantes

Variante	media	grupo Duncan
Testigo	2.684	A
Gigante	1.83	A
Enano	1.55	A

El análisis estadístico por la tasa de multiplicación (Anexo 15.) no detectó diferencias significativas ($P=0.1576$), lo que sugiere que la capacidad de brotación no es estadísticamente diferente entre los variantes comparados con el testigo.

4.2.5 Estudio de algunas características morfológicas en variantes a nivel de invernadero

El análisis de varianza para la altura (Anexo 16.) detectó diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) entre variantes y lecturas mensuales. El cuadro 17. y Fig.27. muestran que el variante gigante sobrepasa en más de 5 cm. tanto al enano y el testigo. Las pruebas comparativas entre variante se muestran en el Anexo 24.

El análisis estadístico para el diámetro del pseudotallo (Anexo 17.), demuestra que no hay diferencias significativas entre variantes, ni la interacción variante*lectura. La medias en cms. fueron: testigo=1.31 ; enano=1.28 ; gigante 1.25. lo cual demuestra mucha similitud entre los variantes. Las pruebas comparativas entre variante se muestran en el Anexo 24.

La longitud de la hoja presentó diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) entre los variantes; lecturas y la interacción variante*lectura (Anexo 18.). El gigante sobrepaso en más de 3 cms. que el testigo y enano (Cuadro 17.; Fig. 28.). Las pruebas comparativas entre variante se muestran en el Anexo 24.

El ancho de la hoja presentó diferencias altamente significativas ($P=0.0001$) entre variantes y lecturas; pero no fue significativa la interacción variante*lectura (Anexo 19.). El testigo fue el que tuvo hojas más anchas que el enano y el gigante (Cuadro 17.; Fig. 28.). Las pruebas comparativas entre variante se muestran en el Anexo 24.

El índice foliar (relación largo de la hoja entre el ancho), fue altamente significativo (Anexo 20.), el gigante presento el mayor índice con 3.62 y el menor el testigo con 2.69. Este índice es muy utilizado para clasificaciones morfológicas en Musa.

El análisis estadístico para el largo del peciolo registró diferencias altamente significativas ($P=0.0001$), para variante, lecturas y para la interacción variante*lectura (Anexo 21.). El gigante sobrepaso en más de 1.75 Cms en la longitud del peciolo que el enano y testigo (Cuadro 17.; Fig. 29.). Las pruebas comparativas entre variante se muestran en el Anexo 24.

El número de hojas reportó diferencias altamente significativas ($P=0.0001$), entre los variantes por lecturas e interacción variante*lectura. (Anexo 22.) El enano presentó mayor número de hojas que el testigo y gigante. Las pruebas comparativas entre variante se muestran en el Anexo 24.

El análisis de varianza para el ángulo de inserción la hoja detectó diferencias altamente significativas ($P=0.0001$), entre variantes, lectura y la interacción variante*lectura (Anexo. 23). Las pruebas comparativas entre variante se muestran en el Anexo 24. La Figura 30. presenta el ángulo de inserción de la hoja por cada variante.

Cuadro 17. Comparación de algunas características morfológicas entre el testigo, enano y gigante a 3 meses de crecimiento en invernadero.

Variable	testigo		enano		gigante	
	media	E.S.	media	E.S.	media	E.S.
Altura (cm)	15.83	±1.54	15.2	±0.17	21.30	±1.39
Diámetro (cm) seudotallo	1.31	±0.13	1.28	±0.19	1.25	±0.11
Largo hoja (cm)	20.46	±1.46	20.1	±2.45	23.39	±1.48
Ancho hoja (cm)	7.60	±0.70	6.49	±0.29	6.46	±0.55
Indice foliar	2.69	±0.17	3.13	±1.17	3.62	±0.31
Longitud (cm) peciolo	4.19	±0.50	4.07	±0.77	5.91	±0.68
# hojas	6.52	±0.91	7.20	±0.86	6.72	±0.67
Angulo de la hoja	32.52	±3.41	24.80	±3.78	20.72	±1.95

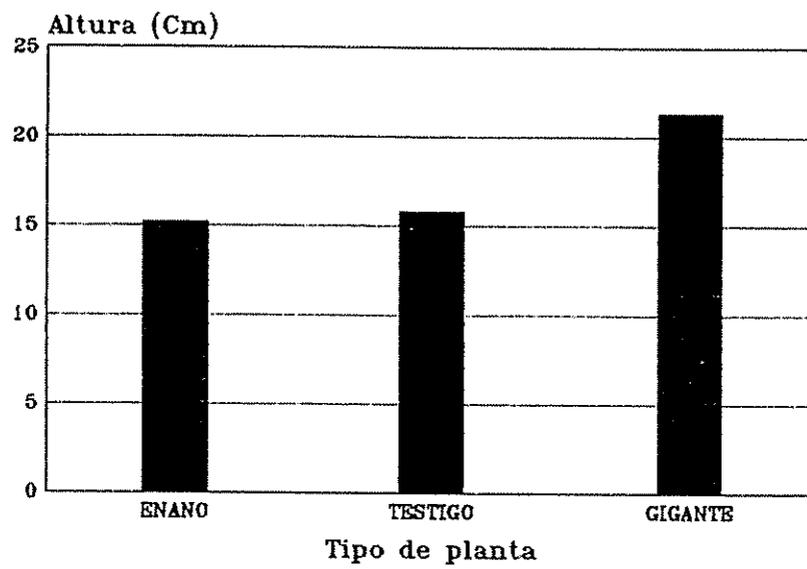


Fig. 27. Altura (Cm) de plantas enano, testigo y gigante a 3 meses de crecimiento en el Invernadero

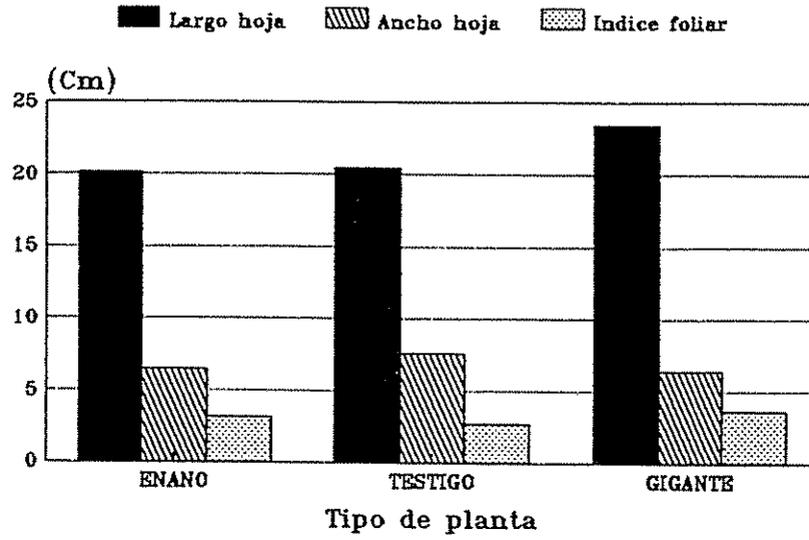


Fig. 28. Longitud, ancho e índice foliar de plantas enano testigo y gigantes a 3 meses de crecimiento en el Invernadero

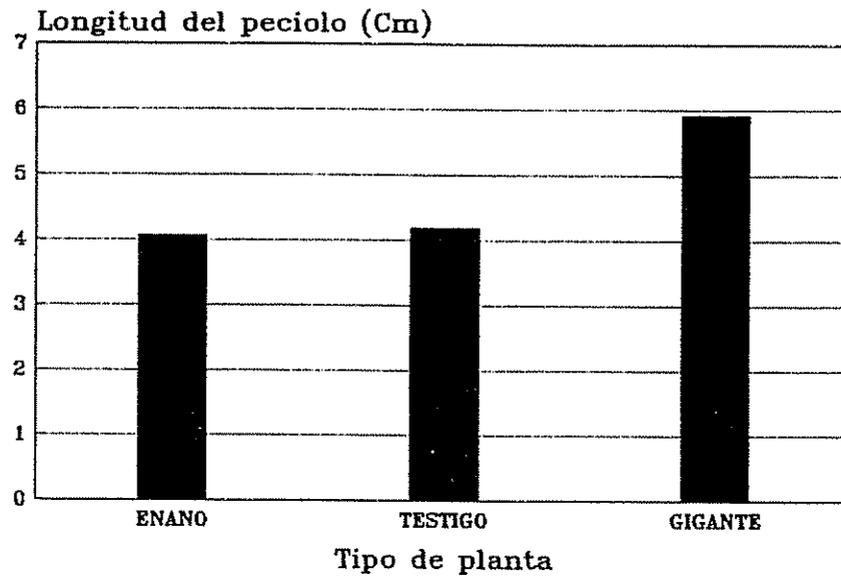


Fig. 29. Longitud (Cm) del peciolo de la hoja de plantas enano, testigo y gigante a 3 meses de crecimiento en el Invernadero

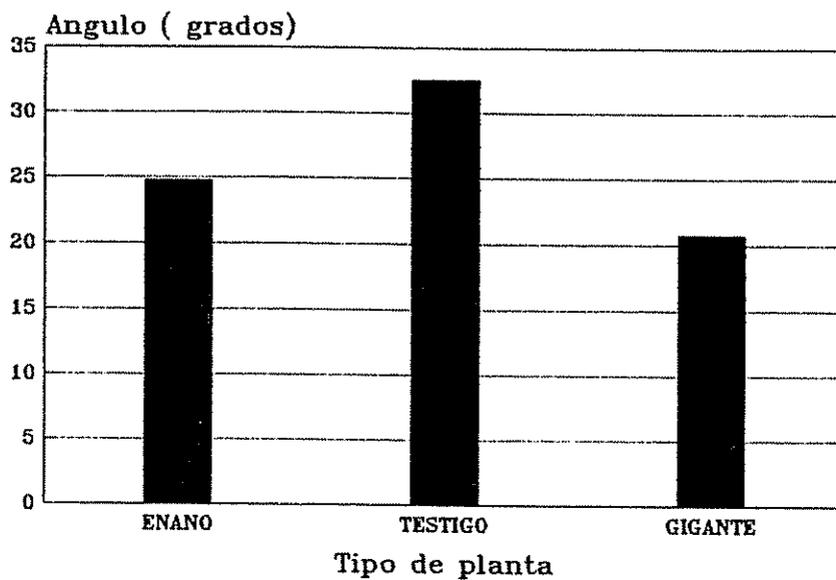


Fig. 30. Angulo de Inserción de la hoja de plantas enano testigo y gigante a 3 meses de crecimiento en el Invernadero

5. DISCUSION

5.1 Experimentos para la conservación de germoplasma

El propósito de la utilización (sacarosa, manitol y ácido triiodobenzoico), fue para reducir la tasa de crecimiento de las plantas; sin que causaran efectos nocivos en el material almacenado; para lograr obtener porcentajes altos de sobrevivencia.

En el presente estudio el efecto causado por los niveles de sacarosa (5,10,15,20,30 g/l), en el crecimiento en altura, número de hojas y formación de raíces, tuvo una tendencia ascendente de 5 a 20 g/l y presentó un mínimo en 30 g/l de sacarosa (Fig.4.;Fig. 10.; Fig. 16.). Este efecto se explica debido a que la sacarosa no solamente actúa como fuente energética; sino que en altas concentraciones aumenta el potencial osmótico del medio, lo que limita la disponibilidad de agua y de los nutrimentos en el medio provocando una disminución en la tasa de crecimiento(Kimball,et al,1975 ; Swarup et al, 1991). Resultados similares fueron registrados por Mora et al (1988), quienes encontraron que concentraciones de sacarosa superiores 60 g/l redujeron el crecimiento de plantas de 'Gran Enano', 'Currare' y 'pelipita. En éste estudio el tratamiento que redujó más la tasa de crecimiento en altura y número de raíces y hojas fue 30 g/l de sacarosa a 15°C. Sin embargo, también fue el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de peso seco en ambos cultivares (Fig. 22A.), éste hecho indica, que acumuló mayor cantidad de materia seca, lo cual sugiere que aprovecho mejor los nutrimentos del medio, que los demás

tratamientos. Posiblemente el incremento en altura, desarrollo de raíces y hojas, que fue mayor en los otros tratamientos (5,10,15,20 g/l de sacarosa), se debió a que acumularon mayor cantidad de agua en los tejidos, lo cual permitió la elongación de las células, debido a la presión de turgencia ejercida por el agua. Sería importante conocer que resultados se obtendrían utilizando un rango mayor de concentraciones de sacarosa en el medio de conservación, incluyendo un tratamiento sin sacarosa.

Por otro lado, la coloración de las plantas al finalizar los 6 meses de almacenamiento fueron normales, solamente en el tratamiento 30 g/l de sacarosa se registraron plantas cloróticas (Fig.21A.). Por otro lado, el porcentaje de sobrevivencia de las plantas en los tratamientos (5,10,15,20,30 g/l) en ambos cultivares fue de un 100%; lo que indica que ningún nivel de sacarosa fue nocivo para el almacenamiento del material.

El efecto del manitol a 0.2M en presencia de diferentes niveles de sacarosa (5,10,15,20,30 g/l), sobre el crecimiento en altura, formación de hojas y raíces, presentó una tendencia ascendente de 5 a 10 g/l sacarosa +0.2M manitol y tuvo su mínimo en el tratamiento 30g g/l sacarosa +0.2M.(Fig. 6.; Fig.12.; Fig.18.). Sin embargo, los porcentajes de peso seco tuvieron un comportamiento ascendente a medida que aumentaron las concentraciones de sacarosa; al igual que en el ensayo donde sólo se utilizó sacarosa. Posiblemente, la concentración de sacarosa en el medio de conservación influya en la capacidad de acumulación de materia seca.

Por otra parte, los porcentajes de sobrevivencia, para los tratamientos con más de 10 g/l de sacarosa fueron menores al 80%. El tratamiento que resultó ser el mejor fue el 5 g/l de sacarosa +0.2M, debido a que presentó los mayores porcentajes de sobrevivencia 100% y 80 % para 'Currare' y 'Gran Enano' respectivamente. En general el manitol a 0.2M en concentraciones mayores a 10 g/l de sacarosa tuvieron efectos nocivos en el almacenamiento in vitro de los cultivares 'Currare' y 'Gran Enano' (Fig.21B. y 23B.). Resultados similares fueron encontrados por Mora (1987). Quién trabajó con 'Currare', 'Gran Enano' y 'Pelipita' y encontró que el manitol en concentraciones superiores a 60 g/l (0.33M), en cualquier nivel de sacarosa fue detrimental para el desarrollo de las plantas.

El efecto osmorregulador de manitol ha sido reportado por varios autores. Roca et al (1991), encontraron que la combinación de 1% de sacarosa y 1% de manitol redujo la tasa de crecimiento de la yuca (*Manihot esculenta*) in vitro, pero al cabo de 12 meses de almacenamiento se presentaron efectos tóxicos del manitol. Los mismos autores encontraron que cuando se cambió el manitol por sorbitol también se presentó un descenso en la tasa de crecimiento, pero sin efectos tóxicos.

El mecanismo osmorregulador del manitol se base en que no es metabolizable por la célula y en la mayoría de los casos no es absorbido; lo que indica que su efecto es extracelular (Brown et al,1979). Roca et al (1991), consideran que el manitol, sorbitol y

la sacarosa son agentes osmóticos que son difíciles de metabolizar y disminuyen la disponibilidad de agua y de los nutrimentos en el medio de cultivo, lo que provoca reducciones de crecimiento de los cultivos y en algunos casos hasta toxicidad. Los mismos autores consideran que el manitol y sorbitol limitan más el crecimiento que la sacarosa, pero que éstos compuestos interaccionan con la temperatura de conservación provocando efectos tóxicos.

En el presente estudio al finalizar los 6 meses de almacenamiento los porcentajes de plantas cloróticas y necróticas fueron superiores en los tratamientos 20 y 30 g/l de sacarosa + 0.2M de manitol (Fig.21B.), éstos resultados fueron consistentes con los porcentajes de sobrevivencia debido a que los mismos tratamientos (20 y 30 g/l sacarosa +0.2M) presentaron porcentajes de sobrevivencia inferiores a 75% (Cuadro 12.;Fig. 23B.). El cultivar 'Currare' (AAB) tuvo tasas de sobrevivencia superiores que 'Gran Enano' (AAA). Banerjee y de Langhe (1985), consideran que los genomas (AAB y ABB), son más tolerantes al uso de reguladores de crecimiento y al efecto de la temperatura de almacenamiento que el genoma (AAA); éste mismo hecho podría explicar la relativa tolerancia que mostró el cultivar 'Currare' que se refleja en el porcentaje de sobrevivencia (Cuadro 12.; Fig 23B.).

El efecto de diferentes niveles de ácido triiodobenzoico(0,5,10,20,40 mg/l), sobre el crecimiento en altura, número de hojas y raíces fue descendente a medida que se aumentaron las concentraciones de TIBA (Fig.8.; Fig.14. y Fig.20.). Tratamientos de 20 y principalmente 40 mg/l son completamente

letales para conservar germoplasma de Musa c.v 'Currare' y 'Gran Enano'. El mejor tratamiento fue 5 mg/l de TIBA, debido a que redujo el crecimiento de las plantas, con altos porcentajes de sobrevivencia 100 y 80 % en 'Currare' y 'Gran Enano' respectivamente (Cuadro 12.; Fig 23C.).

Por otro lado, el porcentaje de peso seco en ambos cultivares fue ligeramente descendente a concentraciones mayores de 10 mg/l de TIBA (Fig.23C), en 'Currare', el menor porcentaje de peso seco correspondió a 40 mg/l de TIBA y en 'Gran Enano' a 00 mg/l de TIBA. lo cual sugiere que los datos no tuvieron una tendencia definida, en ambos cultivares. Es importante señalar que todos los tratamientos contenían 30 g/l de sacarosa en el medio, quizá ésta sea la causa por la cual el porcentaje de peso seco no se presentó una clara tendencia como en los ensayos de sacarosa y manitol.

Al final de los 6 meses de almacenamiento el porcentaje de plantas cloróticas y necróticas fue elevado (Fig.21C.); estos resultados fueron consistentes con los porcentajes de sobrevivencia, que demostraron que a niveles de 20 mg/l de TIBA los porcentajes de sobrevivencia fueron inferiores a 70%, mientras que en el nivel de 40 mg/l de TIBA en ambos cultivares fueron inferiores a 50% (Fig. 23C.). Al igual que para el ensayo con manitol el cultivar 'Currare' (AAB) soportó más el efecto inhibitor del TIBA, lo cual se refleja en los porcentajes de sobrevivencia. Este hecho, posiblemente se pueda explicar por la constitución génica apuntada anteriormente.

El ácido triiodobenzoico (TIBA), pertenece al grupo de las morfactinas, se ha demostrado que puede participar en diferentes procesos fisiológicos en las plantas. Leopold (1948), realizó aplicaciones de TIBA de 25 mg/l en plantas de cebada en invernadero y encontró que favoreció la formación de retoños, debido a que el TIBA, tuvo un efecto inhibitor sobre el transporte de las auxinas. Resultados similares fueron encontrados por Langer et al(1973), donde aplicaciones de 1% de TIBA, tuvo un efecto inhibitorio en el transporte de las auxinas en brotes de trigo, lo cual bloqueó la dominancia apical y favoreció la elongación de los retoños en crecimiento. Kaldewey et al (1972), considera que la acción inhibitor del TIBA reportada en soya, cebada y trigo, probablemente se deba a que afecta el transporte de las auxinas inhibiendo el crecimiento de las plantas.

Por otra parte, Witter y Hillyer (1954), encontraron que aplicaciones de 25 ppm de TIBA, modificaron la expresión sexual en dos cultivares de cucurbitas, estimulando la esterilidad masculina, lo cual aumentó la aparición de flores femeninas. Por otro lado, Nickel (1982); encontró que el TIBA, también tiene propiedades gametocidas inhibiendo la formación de polen.

5.2 Estudio de variantes a nivel in vitro e invernadero

5.2.1 Estudios histológicos

Los cortes transversales de la lámina de la hoja, realizados en plantas testigo, enano y gigante (Fig. 24.), demuestran que la

anatomía interna de la lámina foliar fue muy similar entre los variantes, tanto a nivel in vitro, como en invernadero. No se registraron diferencias en el número de capas de células en los tejidos, ni en la organización y localización de los tejidos. En ambas condiciones de crecimiento la estructura interna de la lámina foliar está conformada por una epidermis e hipodermis uniestratificada en ambas superficies, parénquima de empalizada adaxial, parénquima esponjoso, haces vasculares y células laticíferas asociadas al floema. Sandoval (1989), realizó estudios anatómicos y morfológicos comparativos en planta en tres estados de crecimiento (in vitro, invernadero y de campo), y concluyó que los cambios anatómicos en las plantas, durante la fase de aclimatación son graduales y que solamente hasta el octavo y noveno mes existe una estructura interna característica de una planta adulta.

Por otra parte, en Musa es bastante difícil encontrar diferencias en la anatomía interna de las hojas, incluso entre distintos cultivares (Vásquez, 1992. Comunicación personal).

Las secciones transversales de lámina foliar (Fig.25.), ilustran la anatomía interna de plantas testigo, enano y gigante. Al igual que en la lámina foliar no se identificaron diferencias, tanto a nivel in vitro, como en invernadero. Internamente la vaina foliar está constituida por una epidermis glabra en ambas superficies que está compuesta de una capa de células.

Adyacente a la epidermis se localizan células parenquimatosas con granúlos de almidón. Los grandes espacios aeríferos se

localizan al centro de la vaina. También se observan haces vasculares, haces de fibras libriformes y células laticífera asociadas al floema.

Sandoval (1989), encontró que en la vaina foliar las células parenquimatosas poseen muchos granúlos de almidón e inclusiones tipo rafidios que en su mayoría son de oxalato de calcio. En ésta investigación fue más frecuente observar los granúlos de almidón que los rafidios

5.2.2 Recuento de estomas y tamaño (largo y ancho de los estomas)

El análisis estadístico para el recuento de estomas a nivel in vitro (Anexo 9.) y a nivel de invernadero (Anexo 10.), no registró diferencias significativas en el haz ni en el envés entre los variantes. En ambos estados de crecimiento (in vitro e invernadero), el número de estomas fue superior en el envés que en el haz (Cuadro 13.). Aunque en algunos cultivares como 'Gran Enano' presenta un número elevado en ambas superficies (Soto, 1990). Reuveni (1988), realizó recuentos de estomas en banano con variantes de follaje anormal (mosaico) en los cultivares 'Gran Enano' y 'Williams' encontrando que el número de estomas a nivel in vitro, fue menor en el variante mosaico (5.9/mm² en el haz y 47.4/mm² en el envés) y el testigo (15.5/mm² en el haz y 80.9/mm² en el envés). Es muy probable que la variabilidad en la cantidad de estomas esté más relacionada a variantes con deformaciones a nivel del follaje, que es el caso de los mosaicos y no para variantes en estatura de la planta, que

es el caso de los enanos y gigantes, lo cual no permite detectar diferencias entre enanos y gigantes.

Se considera que el número de estomas está influenciado por varios factores: nivel de ploidía de la planta, edad de la planta; por el cultivar estudiado y por condiciones de crecimiento (Reuveni, 1988). Sin embargo, en ésta investigación la cantidad de estomas en plantas in vitro comparadas con las de invernadero fueron muy parecidas. O sea que el número de estomas no fue directamente proporcional con el crecimiento vegetativo.

En cuanto a el largo y el ancho de los estomas, los análisis de varianza, no registraron diferencias significativas a nivel in vitro (Anexo 11. y 12.), como en invernadero (Anexo 13. y 14.). Estos resultados, quizá estén relacionados con la densidad de estomas (número de estomas por unidad de superficie), probablemente cuando existe variación en el tamaño de los estomas, es muy posible que la cantidad de estomas por unidad de superficie también sea afectada. Por otro lado, todas las plantas pertenecen a un mismo cultivar ('Currare'), y quizá las diferencias en altura de la planta (enano y gigante), no corresponden a cambios en la longitud ni el ancho de los estomas.

Sandoval (1989), realizó mediciones de el largo y el ancho de estomas en el cultivar 'Gran Enano', encontró que el estoma en promedio mide 38µm y 15µm de largo y ancho respectivamente. En ésta investigación se realizaron mediciones en el cultivar

'Currare', y en promedio el largo fue de 32-35 μm y el ancho de 22- 24 μm . respectivamente.

La figura 26. presenta las vistas paradermales de la lámina foliar, que ilustra los estomas de la planta testigo, enano y gigante en el envés. Se puede observar que la cantidad y el tamaño de los estomas es muy similar y que la forma de las células subsidiarias varía en forma y tamaño aún dentro de un mismo variante. Sandoval (1989), encontró que en la mayoría de los casos el estoma se encuentra rodeado por cuatro células subsidiarias, que difieren en forma y tamaño.

Por otro lado, la acumulación de ceras es mayor en plantas en invernadero que las in vitro, lo cual ésta relacionado con diferentes condiciones de de crecimiento (in vitro e invernadero) y con el desarrollo fenológico de las plantas.

5.2.3 Estudios de cariotipo

El análisis de cariotipo en general no encontró diferencias en el número de cromosomas entre variantes y el testigo: enano=32.81; testigo=33.07; gigante=32.90. Aunque, el número de células observadas fueron pocas para determinar con mayor precisión si existen diferencias entre los variantes. Sin embargo, los datos (Cuadro 14.), sugieren, que hubo cambios en el número de cromosomas en algunas células; tanto en los variantes(enano y gigante), como en el testigo. El análisis para el enano de 16 células observadas 3

presentaron diferente número de cromosomas (3 con 32 cromosomas), para un porcentaje de células aneuploides de 18.75. El gigante de 21 células analizadas 4 fueron aneuploides (3 con 32 y 1 con 34 cromosomas), para un porcentaje de 19% de células aneuploides. El testigo de 14 células observadas sólo 1 presentó 34 cromosomas, para un porcentaje de 7.14 % de células aneuploides. En general el porcentaje de aneuploidia fue superior en los variantes que en plantas normales

Shepherd y dos Santos (datos no publicados), realizaron recuentos de cromosomas en células de ápices de raíces de banano de diversos orígenes y encontró que hasta en plantas triploides propagadas convencionalmente hubo células con errores en el número de cromosomas y/o con rompimientos evidentes de cromosomas. Sin embargo, éstos defectos fueron más comunes en plantas provenientes de cultivo de meristemas con 5 mg/l de BAP. Plantas provenientes de cultivo de callos presentaron una pérdida extrema de cromosomas. Por otro lado, clones diploides presentaron mayor estabilidad que los clones triploides.

Reuveni (1988), Encontró que en los variantes de mosaico en los cultivares 'Williams; y 'Gran Enano', hubo cambios de ploidia con un número cromosómico entre 35-37. El mismo autor considera que con el incremento de la ploidía se incrementa el espesor de las hojas y el tamaño y forma de los estomas también es afectada.

En la presente investigación el variante gigante tuvo el mayor % de células aneuploides y a nivel de invernadero fue el que más

conservó la característica de altura. Por otro lado el enano y el testigo no se diferenciaban a simple inspección, posiblemente éste hecho se deba a la condición semienano del testigo.

5.2.4 Tasa de multiplicación

El análisis de varianza para la tasa de multiplicación de los variantes no detectó diferencias estadísticas; en promedio las tasas de multiplicación fueron: testigo = 2.69 ; gigante=1.83 y enano=1.55 . Resultados similares fueron informados por Kerbellec (1991), que trabajo con el variante enano de el cultivar 'Gran Enano', comparado con el testigo; el medio de multiplicación usado fue Murashige y Skoog (1962), suplementado con 2 mg/l de BAP, y 2 mg /l de AIA, se encontró que en los primeros tres ciclos de subcultivo las tasas de multiplicación oscilaron entre 1 a 2. Sin embargo en el ciclo cuarto y quinto, presentaron tasas de multiplicación superiores a 3 y 4 , y en el sexto ciclo la tasa de multiplicación descendio tanto en el testigo como en el enano.

Reuveni (1990), realizó estudios en el cultivar 'Williams', en 6 generaciones de los variantes: mosaico, enano, plantas con tallo y peciolo rojizo y el testigo; encontrando que la tasa de multiplicación no fue estadísticamente diferente entre los variantes. Sin embargo, encontró una tasa de multiplicación es más baja en los mosaicos que en las plantas testigo. Por otra parte, el mismo autor sostiene que no es posible encontrar diferencias visuales entre los variantes a nivel in vitro, durante las 6 generaciones evaluadas.

Cronauer y Krikorian (1984), Realizaron estudios sobre la tasa de multiplicación en tres cultivares de banano ('Gran Enano', 'Philippine' y 'Lacatan') y dos en plátano ('Pelipita' y 'Saba'), encontrando que concentraciones de 5 mg/l de benzilaminopurina estimuló la formación de nuevos brotes logrando tasas de multiplicación hasta de 9.1. Comparadas con tasas entre 1-3 cuando no se aplicó la fitohormona.

Por otro lado, la tasa de multiplicación está influenciada por el cultivar micropropagado, y por el número de subcultivos realizados. Banerjee y de Langhe (1985) trabajaron con 8 cultivares de Musa y encontraron que en la mayoría de los cultivares hasta el 6 subcultivo la brotación es ascendente y luego desciende. Esto se explica por el efecto de habituación del explante a la presencia de la fitohormona.

5. 2.5 Estudio de algunas características morfológicas entre variantes a nivel de invernadero

El Cuadro 17. presenta las características morfológicas que fueron evaluadas durante 3 meses en el invernadero. La variable altura registró diferencias estadísticas entre los variantes y el testigo (Anexo 16.; Anexo 24.) Sin embargo el variante que se distinguió con mayor facilidad fue el gigante, debido a que sobrepasó en más de 5 cm. al testigo y al enano (Fig.27.). La razón

por la cual a nivel de invernadero no se pudo detectar el enano de el testigo, es porque el tratamiento testigo corresponde a el cultivar 'Curre' seminano, que por naturaleza es pequeño. Sin embargo, sería conveniente evaluar ésta característica a nivel de campo, para constatar si en esas condiciones se podrían detectar diferencias. Sandoval et al(1991) evaluaron en condiciones de campo dos generaciones de variantes de Musa (AAB) c.v. 'Falso cuerno' encontrando que el gigantismo fue la variante más estable. Los mismos autores encontraron que el enanismo fue el variante más frecuente a nivel de campo constituyendo el = 37 % del total de las variaciones.

En cuanto al diámetro del seudotallo el análisis estadístico no fue significativo (Anexo 17.), las plantas presentaron diámetros que oscilaron entre 1.25-1.31 cms. Para este estudio ésta característica es de muy poca utilidad para la identificación de variantes a nivel de invernadero, debido a que hasta en condiciones de campo las plantas presentan diámetros similares.

Los análisis para el largo, ancho de la hoja e índice foliar registraron diferencias altamente significativas entre los variantes (Anexo 18. y Anexo 19.; Anexo 20.), el gigante presentó mayor longitud de las hojas y también mayor índice foliar (Fig. 28.). El índice foliar está dado por la relación entre el largo de la hoja entre su ancho. Kerbellec (1991), considera que el índice foliar es una de las caracterpística más importantes para diferenciar variantes enanos en la fase de aclimatación; debido a que se presenta una disminución en el índice foliar, que más se

debe a una reducción en la longitud de las hojas que en el ancho. El mismo autor considera que la variación somaclonal afecta más a los procesos de elongación celular más que su expansión radial.

En esta investigación las diferencias en cuanto al índice foliar se debieron a variaciones en la longitud de las hojas y no en su ancho, el gigante presentó hojas más largas que el enano y testigo. El enano y el testigo presentaron longitud de hojas casi iguales (Fig. 28.; Anexo 24.). Nuevamente se destaca que posiblemente el enano no se diferencie del testigo debido a que éste último, es típico de un semienano, quizá al ser comparado con plátano corriente hubiera sido posible distinguir los enanos mediante éste parámetro.

En cuanto a la longitud del peciolo el gigante sobrepaso en más de 1.75 cm. al testigo y al enano; se observa que el enano no difiere en la longitud del peciolo con el testigo (Fig.29.; Anexo 24.). Daniells y Smith (1991), consideran que la longitud del peciolo, el índice foliar y diferencias en altura son los parámetros más importantes para identificar variantes a nivel de invernadero. En ésta investigación, mediante éste parámetro de la longitud del peciolo, se pudo diferenciar los gigantes, pero los enanos no se diferenciaron de los testigos. Posiblemente éste hecho se deba a la condición semienana del testigo. Sandoval et al (1991), reportaron que a nivel de campo los variantes de Musa (AAB) c.v. 'Falso Cuerno' con peciolos largos estuvieron relacionados con plantas de porte alto.

Con relación a la presencia de follajes con hojas péndulas el testigo presentó mayor presencia de hojas péndulas (Fig.30.). Sandoval et al (1991), encontraron que a nivel de campo los variantes más inestables fueron los relacionados con el follaje (hojas péndulas y filotaxia inusual). Vuylsteke et al (1988), reportaron que la presencia de hojas péndulas fue uno de los variantes más frecuentes en plantas de plátano evaluadas a nivel de campo, constituyendo un 37% del total de los variantes. Los mismos autores señalan que la variación más frecuente a nivel de campo es la reversión a fruto 'French'; este mismo resultado fue detectado por sandoval et al (1991).

6. CONCLUSIONES

Los tratamientos 30 g/l de sacarosa, 5 g/l de sacarosa +0.2M de manitol y 5 mg/l de TIBA a 15°C, fueron los mejores tratamientos para reducir la tasa de crecimiento de las plantas de 'Currare' y 'Gran Enano'.

Niveles de TIBA superiores a 20 mg/l y concentraciones de 0.2M de manitol en combinación con niveles de sacarosa superiores a 20 g/l a 15 °C, tienen un efecto tóxico, para conservar germoplasma de los cultivares 'Currare' y 'Gran Enano'.

Concentraciones de sacarosa de 5 a 30 g/l a 15°C no fueron perjudiciales para conservar germoplasma de 'Currare' y 'Gran Enano', debido a que los porcentajes de sobrevivencia fueron de 100%, en ambos cultivares.

El cultivar 'Currare', presentó mayores porcentajes de sobrevivencia en presencia de manitol y de TIBA, que el cultivar 'Gran Enano'.

El efecto de la temperatura a 15 °C per se, independientemente de las concentraciones de sacarosa, manitol y TIBA, es un método eficiente para conservar germoplasma de 'Currare' y 'Gran Enano' in vitro.

La identificación de variantes enanos y gigantes a nivel in vitro no fue posible. A nivel de invernadero a un mes de crecimiento se pudieron identificar con mucha claridad los variantes gigantes, mediante la longitud del peciolo y la altura.

Los estudios histológicos de la lámina foliar, no registraron diferencias en la anatomía interna de los variante enano, gigante y del testigo, tanto a nivel in vitro, como en invernadero.

Los estudios histológicos a nivel de la vaina foliar, determinaron que la anatomía interna de los variantes(enano y gigante) y del testigo son muy similares, y no permiten detectar diferencias, a nivel in vitro ni en invernadero.

Los recuentos de los estomas no permitieron detectar diferencias entre variantes a nivel in vitro y de invernadero. Sin embargo la cantidad de estomas fue superior en el envés que en el haz.

El largo y el ancho de los estomas fueron muy similares entre los variantes y el testigo, en ambas condiciones de crecimiento (in vitro e invernadero).

Aunque el número de células analizadas fue muy pequeño. El número cromosómico vario entre 32-34, y el porcentaje de células aneuploides fue superior en los variantes que en la planta testigo.

7. RECOMENDACIONES

Evaluar un rango más amplio en los niveles de sacarosa en el medio de conservación, incluyendo un tratamiento con 0 g/l de sacarosa..

Utilizar como agente osmorregulador al sorbitol, debido a que ha dado buenos resultados en la conservación in vitro de otros cultivos

Estudiar el efecto de varios niveles de temperatura de conservación para conocer su potencial real, en la conservación de germoplasma in vitro.

Realizar nuevamente las observaciones de los variantes y testigo a nivel de invernadero con un número mayor de plantas y con un testigo común, que sea representativo del cultivar evaluado.

Realizar pruebas de multiplicación por varios ciclos, para conocer el comportamiento de la tasa de de multiplicación a través del tiempo

Sembrar en el campo los variantes gigantes, enanos y el testigo y evaluarlos por varias generaciones, para conocer si expresan su fenotipo y si lo logran mantener a través de sus progenies.

Realizar nuevamente el recuento de cromosomas en las plantas variantes y el testigo, donde se considere un número mayor de células observadas.

Desarrollar estudios de cariotipo de variantes en distintas condiciones de crecimiento (in vitro, invernadero y de campo), para conocer si existen diferencias en la ploidía en estos tres estados de crecimiento.

Realizar diagnósticos moleculares para conocer la naturaleza genética de la variación somaclonal.

8. LITERATURA CITADA

- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A.; MORA, A.; VILLALOBOS, V. 1992. Cryopreservation of zygotic embryos of Musa acuminata (AA) and Musa balbisiana (BB). *Cryo-letters* 13:159-164.
- ARIAS, O. ; VALVERDE, M. 1986. Producción y variación somaclonal de plantas de banano c.v. Gran naine producidas por cultivo de tejidos. *ASBANA (C.R.)* 11 (28):6-11.
- .; VALVERDE, M. 1988. Performance and somaclonal variation of in vitro propagated banana plants. In Reunion ACORBAT(8,1987, Santa Marta, Colombia). *Memorias*. Eds. R. Jaramillo; A. Restrepo; A. Bayona. Medellín, Colombia, AUGURA p. 75-76.
- BALDEV, B.; LANG, A.; AGAPEP, A.O. 1965. Gibberellin production in pea seeds developing in excised pods: effect of growth retardant AMO-1618. *Science (EE.UU.)* 147:155-157.
- BANERJEE, N. ; DE LANGHE, E. 1985. A tissue culture technique for rapid clonal propagation and storage under minimal growth conditions of Musa (banana and platin). *Plant Cell Reports (EE. UU.)* 4:351-354.
- BROWNM, D.D.; LEUNG, D.W.M.; THORPE, T. 1979. Osmotic requeriment for shoot formation in tobacco callus. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 49:36-41.
- CHAMPION, J. 1961. El plátano. Edí. Blume, Barcelona (España). 247 p.
- CRONAUER, S.S.; KRIKORIAN, A.D. 1984. Multiplication of Musa from excised stem tips. *Annals of Botany (G.B.)* 53:321-328.
- DANIELLS, J.; SMITH, M. 1991. Post-flask manegement of tissue-cultured bananas. *ACIAR. Technical Reports N° 18*. 8 p.
- ESQUINAS, A.J. 1981. Los recursos fitogenéticos una inversión segura para el futuro. Madrid, España, Consejo de Recursos Fitogenéticos ; Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias. 44 p.

- HILLEL, S.; SHIMON, M.; BURGER, D.; REID, M. 1989. The role of ethylene in the inhibition of rooting under low oxygen tension. *Plant Physiology* 89:165-168.
- HWANG, S.C. 1987. Fusarial wilt of cavendish bananas in Taiwan. *In* Reunion ACORBAT(7,1985, San José, C.R.). Memorias. Eds. J.J. Galino; R. Jaramilo, San José C.R. INIBAP. p. 57-66.
- IBPGR. 1983. IBPGR Advisory committee on in vitro storage:report of the first meeting . Roma 11 p.
- INIBAP. 1989. Looking ahead a strategy of choice. Montpellier, Francia. 71 p.
- ISRAELI, Y.; REUVENI, O.; NAMERI, N. 1986. Genetic variability and performance of in vitro propagated banana plants. *In* Reunión sobre Agrofisiología del Banano (4,1986, San José, C.R.). Memorias. San José, C.R., ASBANA. p.
- ISRAELI, Y.; REUVENI, O. ; LAHAV, E. 1991. Qualitative aspects of somaclonal variations in banana propagated by in vitro techniques. *Scientia Horticulturae* (Holanda) 48:71-88.
- JARAMILLO, R. 1983. Conservación del germoplasma y mejoramiento genético del banano y del plátano Informe Mensual UPEB (Panamá) 7:8-10.
- KARTHA, K. ; MROGINSKI, L.A. ; PAHL, K. ; LEUNG, N. 1981. Germoplasm preservation of coffeea (Coffea arabica L.) by in vitro culture of shoot apical meristems. *Plant Science Letters* (Holanda) 22:301-307.
- JOUBE, F.; ENGELMANN, A.; CHARRIER, A. 1991. Effets de l'hypoxie et de la température sur la conservation in vitro de pousses feuillées de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé* 35(3):205-210.
- KALDEWEY, H. ; GINKEL, U.; KARMANN, R.; PALAND, I. 1977. Interactions in translocation of growth regulators in shoots with special reference to auxin transport as affected by two inhibitors a morfhactin and lycoricidinol. *In* Plant growth regulation. Ed. Pilet, P. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Alemania. p. 91-99.

- KERBELLEC, F. 1991. Caracterisation morphologique de vitroplants variants nains de bananier (*Musa acuminata* c.v. Grande Naine). Analyse qualitative du metabolisme des gibberellines. Tesis Diplomado. CIRAD, Montpellier, Francia. 20 p.
- KIMBALL, S.L.; BEVERSDORF, W.A.; BIGHAM, E.T. 1975. Influence of osmotic potential on the growth and development of soybean tissue culture. *Crop Science (EE.UU.)* 15: 750-753.
- LANGER, R.H.; PRASAD, P.C.; LAUDE, H.M.. 1973. Effects of kinetin on tiller bud elongation in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Annals of Botany* 37:565-571.
- LARKIN, P.; SCROWCROFT, W.R. 1981. Somaclonal variation a new source of variability of cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics (EE.UU.)* 60:197- 214.
- LEE, M.; PHILLIPS, R.L. 1988. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39:413-437.
- MORA, M. I. 1987. Uso de osmorreguladores e inhibidores quimicos para la conservaci3n de germoplasma de in vitro de *Musa* sp. Tesis Mag Sc. CATIE Turrialba, C.R. 95 p.
- ; SANDOVAL, J.F.; MULLER, L. 1988. Utilizaci3n del efecto osm3tico en la conservaci3n in vitro de *Musa*. In Reuni3n sobre Agrofisiologia del Banano (4,1986, San Jos3, C.R.). Memorias. San Jos3, C.R., ASBANA. p. 149-155.
- MROGINSKI, L.A.; ROCA, W.M. 1991. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. .In Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed.. W. Roca; L. Mroginski. Cali, Colombia, CIAT. p. 19-40
- MURASHIGE, J. ; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology (EE. UU.)* 15:473-497. .
- MURASHIGE, J. Y SKOOG, F. 1965. Effects of stem elongation retardants and gibberellin on callus on growth and organ formation in tabbaco tissue culture. *Physiologia Plantarum (Dinamarca)* 18:665-672.

- NICKELL, L. 1982. Plant growth regulators. Springer-Verlag. Berlin, Heidelberg, Alemania. 173 p.
- NUÑEZ, P.; SANDOVAL, J.F.; MULLER, L. 1988. Determinación de la temperatura 'cero crecimiento' en Musa (AA,AAA, AAB, ABB) bajo condiciones in vitro y su importancia en la conservación de germoplasma. In Reunión sobre Agrofisiología del Banano (4,1986, San José, C.R.), Memorias. San José, C.R., ASBANA p. 131-141.
- PANIS, B. J.; WITHERS, L.A.; DE LANGHE, E. 1990. Cryopreservation of Musa suspension cultures and subsequent regeneration of plants. Cryo-letters 11:337-350.
- PLUCKNETT, G.L. ; SMITH, N.J.H. ; WILLIAMS, J.T.;ANISHETTY, N.M. 1983. Crop germoplasm conservation and developing countries. Science (EE. UU.) 220:163- 169.
- POOL, D.J.; IRIZARRY, H. 1987. Off type banana plants observed in a commercial planting of Grain Nain propagated using the in vitro culture technique. In Reunion ACORBAT(7,1985, San José, C.R.). Memorias. Eds. J.J. Galino; R. Jaramilo, San José C.R. INIBAP. p. 99-102
- PURSEGLOVE, I. 1981. Tropical crops: Monocotyledons. New York, Academic press. 597 p.
- QUEROL, D. 1988. Recursos genéticos, nuestro tesoro olvidado. Aproximación técnica y socioeconómica. Lima Perú, Editorial Industrias Gráficas S.A. . 218 p.
- REUNION REGIONAL de INIBAP PARA AMERICA LATINA Y EL CARIBE (1986, Turrialba, C.R.). 1987. Memorias. Eds. por R. Jaramillo; N. Mateo. San José, C.R.. 280 p.
- REUVENI, O. 1988. Methods for detecting somaclonal variants in williams bananas. In Workshop on Identification of Genetic Diversity in the Genus Musa (1988, Los Baños Filipinas). Proceedings. Los Baños, Filipinas, INIBAP. 13 p.
- ; ISRAELI, Y. 1990. Measures to reduce somaclonal variation in in vitro propagated bananas. Acta Horticulturae. 175:307-313.

- ROCA, W.; ARIAS, D.I. ; CAHVEZ, R. 1991. Métodos de conservación in vitro del germoplasma .In Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed.. W. Roca; L. Mroginski. Cali, Colombia, CIAT. p. 697-730
- SANDOVAL, J.F. 1985. Micropropagación de musáceas. ASBANA, (C.R.) 9:21-23.
- . 1989. Estudio de la anatomía y morfología vegetativas de plantas de Musa in vitro, en condiciones de aclimatación y en el campo. Tesis. Mg. Sc. CATIE, Turrialba Costa Rica. 178 p.
- SANDOVAL, J.F.; MULLER, L. 1989. Consideraciones sobre la conservación in vitro de musáceas: posibilidades y limitaciones. ASBANA (C.R.) 13(31):21-24.
- ; TAPIA, C.; MULLER, L. ; VILLALOBOS, V. 1991 Observaciones sobre la variabilidad encontrada en plantas micropropagadas de Musa c.v. 'Falso Cuerno' AAB. Fruits (Francia) 46:533-539
- SCOWCROFT, W.R. 1984. Genetic variability in tissue culture: impact on germoplasm conservation and utilization. A technical report. Rome, IBPGR. 41 p.
- SHEPHERD, K.; DANTAS, J.L.; ALVES, E.J. 1986. Aspects of banana breeding at the Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura, Brasil. In Reunion ACORBAT (7,1985, San José, C.R.). Memorias San José, C.R., INIBAP p. 75-86.
- SMITH, M.K. 1988. A review of factors influencing genetics stability if micropropagated bananas. Fruits (Francia) 43:219-223.
- SOTO, M. 1990. Bananos: cultivo y comercialización. 2 ed. San José, Costa Rica, ASBANA. 648 p.
- STOVER, R.H.; SIMMONDS, N.W. 1987. Bananas. 3 ed. New York, J. Wiley. 468 p.
- . 1988. Variation and cultivar nomenclature in Musa, AAA group, Cavendish subgroup. Fruits (Francia) 43 (6): 353-357.

- STUSHNOFF, C. ; FEAR, C. 1985. The potential use of in vitro storage for temperate fruit germplasm: A status report. Rome, IBPGR. 21 p.
- SWARUP, K.; MUKHERJEE, B.; RATHINASABAPATHI; GUPTA, N. 1991. Low sugar osmotic requeriments for shoot regeneration from leaf pieces of Solanum melongena L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (Holanda) 25:13-16.
- TABARES. E.; PACHON, J.; ROCA, W. 1991. Variación somaclonal y su aplicación al mejoramiento de cultivos. In Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicaciones. Ed. W. Roca y L. Mroginski. Cali, Colombia, CIAT, p. 339-359.
- THURSTON, H.D. 1989. Enfermedades de cultivos en el trópico. Trad. José Galindo. Turrialba, C.R., CATIE 236 p.
- VILLALOBOS, V. ; ABDELNOUR, A. 1991. Criopreservation of Musa spp. and its potential for long-term storage of other tropical crops. In DNA conservation proceedings. Ed. P. Adams. London. 22 p.
- VUYSTEKE, D.R.; SWENNEN, R. ; WILSON, G. ; DE LANGHE, E. 1988. Phenotypic variation among in vitro propagated plantain (Musa sp. Cultivar AAB). Scientia Horticulturae (Holanda) 36:79-88.
- WITHERS, L.A. 1980. Tissue culture storage for genetic conservation. IBPGR. Technical Report 80/8. 91 p
- _____. 1990. Prospects and problems of in vitro genebanks. In Musa conservation & documentation. Proceedings of workshop held in Leuven, Belgium. INIBAP/IBPGR. p. 21-24.
- WITTEW, S.H.; HILLYER, I.G. 1954. Chemical induction of male sterility in cucurbits. Science 120:873-874.

9. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para el efecto de diferentes niveles de sacarosa en el crecimiento en altura de dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15°C

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
Cultivar	1	27.564	92.57	0.0001**
Trat.	4	9.075	30.48	0.0001**
Cultivar*Trat	4	4.700	15.79	0.0001**
Rep(Cultivar*Trat)=E _a	189	0.297	10.42	0.0001**
Lectura	5	4.093	143.17	0.0001**
Cultivar*Lectura	5	0.1093	3.83	0.0019**
Trat.*Lectura	20	0.3001	10.50	0.0001**
Cultivar*Trat*Lectura	20	0.1097	3.84	0.0001**
Error=E _b	945			
Total	1193			

C.V.=10.62

n*=diferencias no significativas

*=diferencias significativas al 5% de probabilidad

**=diferencias significativas al 1% de probabilidad

Anexo 2. Análisis de varianza para el efecto del Manitol a una concentración de 0.2M en diferentes niveles de sacarosa sobre el crecimiento en altura de dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15°C

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
Cultivar	1	0.7774	2.17	0.1417 ^{ns}
Trat.	5	11.918	33.33	0.0001**
Cultivar*Trat	5	0.1165	0.33	0.8970 ^{ns}
Rep(Cultivar*Trat)=E _a	226	0.3575	26.96	0.0001**
Lectura	5	2.6586	200.47	0.0001**
Cultivar*Lectura	5	0.0254	1.92	0.0885 ^{ns}
Trat.*Lectura	25	0.1895	14.29	0.0001**
Cultivar*Trat*Lectura	25	0.0659	4.97	0.0001**
Error=E _b	1129			
Total	1426			

C.V.=8.094

Anexo 3. Efecto de diferentes niveles de TIBA (ácido triiodobenzoico) en el crecimiento en altura de dos cultivares de Musa evaluados durante 6 meses de almacenamiento a 15°C

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
Cultivar	1	2.1336	6.75	0.0101**
Trat.	4	16.4325	52.00	0.0001**
Cultivar*Trat	4	0.2791	0.88	0.4748 ns
Rep(Cultivar*Trat)=E _a	190	0.3159	23.40	0.0001**
Lectura	5	2.6363	195.21	0.0001**
Cultivar*Lectura	5	0.1493	11.06	0.0001**
Trat.*Lectura	20	0.2930	21.70	0.0001**
Cultivar*Trat*Lectura	20	0.0212	1.57	0.0524 ns
Error=E _b	950	0.0135		
Total	1199			

C.V.=8.91

Anexo 4. Prueba de Chi cuadrado para el efecto de diferentes niveles de sacarosa sobre la producción de hojas y raíces de dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15°C

F.V.	gl	Número hojas		Número raíces	
		X ²	P.	X ²	P
<u>30 días</u>					
Intercepto	1	711.96	0.0000**	223.00	0.0000**
Tratamiento	4	13.31	0.0099**	47.89	0.0000**
Cultivar	1	1.51	0.2188 ^{ns}	17.52	0.0000**
Trat*Cultivar	4	29.83	0.0000**	10.33	0.0352*
<u>60 días</u>					
Intercepto	1	1132.82	0.0000**	354.14	0.0000**
Tratamiento	4	6.26	0.1808 ^{ns}	28.20	0.0000**
Cultivar	1	1.86	0.1722 ^{ns}	28.64	0.0000**
Trat*Cultivar	4	19.93	0.0005**	11.47	0.0218*
<u>90 días</u>					
Intercepto	1	1290.65	0.0000**	463.04	0.0000**
Tratamiento	4	9.49	0.0499*	22.03	0.0002**
Cultivar	1	2.14	0.1436 ^{ns}	44.98	0.0000**
Trat*Cultivar	4	11.27	0.0237*	5.33	0.2548 ^{ns}
<u>120 días</u>					
Intercepto	1	1821.49	0.0000**	497.04	0.0000**
Tratamiento	4	10.36	0.0348*	24.99	0.0001**
Cultivar	1	2.30	0.1293 ^{ns}	29.19	0.0000**
Trat*Cultivar	4	16.17	0.0028**	6.23	0.1827 ^{ns}
<u>150 días</u>					
Intercepto	1	1990.08	0.0000**	496.22	0.0000**
Tratamiento	4	10.38	0.0345*	19.36	0.0007**
Cultivar	1	3.64	0.0564 ^{ns}	23.96	0.0000**
Trat*Cultivar	4	11.65	0.0201*	5.97	0.2017 ^{ns}
<u>180 días</u>					
Intercepto	1	1950.89	0.0000**	509.64	0.0000**
Tratamiento	4	9.44	0.0511 ^{ns}	20.76	0.0004**
Cultivar	1	4.03	0.0448*	25.19	0.0000**
Trat*Cultivar	4	9.17	0.0570 ^{ns}	6.03	0.1969 ^{ns}

Anexo 5. Pruebas de Chi cuadrado para el efecto de manitol en el número de hojas y raíces de dos cultivares de Musa durante 6 meses de almacenamiento a 15°C

F.V.	gl	Número de hojas		Número de raíces	
		X ²	P.	X ²	P.
<u>30 días</u>					
Intercepto	1	186.53	0.00000**	184.00	0.0000**
Tratamiento	5	87.55	0.00000**	19.44	0.0016**
Cultivar	1	3.57	0.0588 ^{ns}	10.79	0.0010**
Trat*Cultivar	5	11.49	0.0424*	12.88	0.0245*
<u>60 días</u>					
Intercepto	1	344.65	0.00000**	209.47	0.0000**
Tratamiento	5	119.09	0.00000**	15.81	0.0074**
Cultivar	1	8.74	0.0031**	1.13	0.2878 ^{ns}
Trat*Cultivar	5	7.54	0.1832 ^{ns}	11.35	0.0448*
<u>90 días</u>					
Intercepto	1	443.70	0.00000**	302.48	0.0000**
Tratamiento	5	126.44	0.00000**	24.28	0.0002**
Cultivar	1	5.29	0.0215*	0.40	0.5283 ^{ns}
Trat*Cultivar	5	13.17	0.0218*	9.39	0.0945 ^{ns}
<u>120 días</u>					
Intercepto	1	506.57	0.00000**	325.06	0.0000**
Tratamiento	5	112.01	0.00000**	23.27	0.0003**
Cultivar	1	13.15	0.0003**	0.35	0.5565 ^{ns}
Trat*Cultivar	5	9.04	0.1075 ^{ns}	13.87	0.0165*
<u>150 días</u>					
Intercepto	1	585.94	0.00000**	328.27	0.0000**
Tratamiento	5	104.87	0.00000**	13.65	0.0002**
Cultivar	1	22.30	0.0000**	0.78	0.3766 ^{ns}
Trat*Cultivar	5	6.37	0.2718 ^{ns}	17.67	0.0034**
<u>180 días</u>					
Intercepto	1	616.40	0.000000**	347.39	0.0000**
Tratamiento	5	113.67	0.00000**	21.19	0.0007**
Cultivar	1	21.97	0.00000**	1.46	0.2268 ^{ns}
Trat*Cultivar	5	6.98	0.2220 ^{ns}	17.27	0.0040**

Anexo 6. Frecuencia para la coloración de plantas para el efecto sacarosa (5,10,15,20,30 g/l) durante 6 meses de almacenamiento a 15°C

	'Currare'		'Gran Enano'	
<i>1 mes</i>	v=verde	c=clorótica	n=necrosada	
5		20v,	17v,3c	
10		19v,1c	17v,3c	
15		20v	17v,3c	
20		19v,1c	20v	
30		16v,4c	15v,5c	
<i>2 mes</i>				
5		20v,	14v,6c	
10		20v	17v,3c	
15		20v	20v	
20		20v,	20v	
30		14v,6c	17v,3c	
<i>3 mes</i>				
5		20v,	14v,6c	
10		19v,1c	19v,1c	
15		20v	19v,1c	
20		20v	20v	
30		12v,8c	20v	
<i>4 mes</i>				
5		20v,	17v,3c	
10		19v,1c	20v	
15		20v	20v	
20		20v	20v	
30		16v,4c	19v,1c	
<i>5 mes</i>				
5		20v,	17v,3c	
10		19v,1c	20v	
15		20v	20v	
20		20v	20v	
30		16v,4c	19v,1c	
<i>6 mes</i>				
5		20v,	19v,1c	
10		20v	20v	
15		20v	20v	
20		20v	20v	
30		18v,2c	19v,1c	

Anexo 7 Frecuencia para la coloración debido al efecto de manitol 0.2M en 5 niveles de sacarosa (5,10,15,20,30 g/l) y un testigo 30 g/l de sacarosa sin manitol (T30), durante 6 meses de almacenamiento a 15°C

	'Currare'		'Gran Enano'
<i>1 mes</i>	v=verde	c=clorótica	n=necrosada
5		14v,6c	9v,11c
10		4v,16c	4v,16c
15		13v,7c	11v,9c
20		9v,11c	15v,3c,2n
30		5v,14c,1n	7v,12c,1n
T30		20v	20v
<i>2mes</i>			
5		14v,6c	4v,16c
10		20v	8v,9c,3n
15		13v,7c	11v,9c
20		9v,10c,1n	10v,6c,4n
30		4v,11c,5n	4v,7c,9n
T30		20v	20v
<i>3 mes</i>			
5		14v,6c	10v,10c
10		20v	8v,9c,3n
15		13v,7c	9v,11c
20		9a,10c,1n	7v,9c,4n
30		4v,11c,5n	3v,7c,10n
T30		20v	20v
<i>4 mes</i>			
5		16v,4c	10v,10c
10		20v	9v,8c,3n
15		13v,7c,	7v,13c
20		9v,10c,1n	6v,9c,5n
30		4v,11c,5n	3v,7c,10n
T30		20v	20v
<i>5 mes</i>			
5		16v,4c	15v,5c
10		20v	9v,8c,3n
15		13v,7c	7v,13c
20		9v,10c,1n	5v,9c,6n
30		4v,11c,5n	1v,7c,12n
T30		20v	20v
<i>6 mes</i>			
5		18v,2c	15v,5c
10		20v	9v,8c,3n
15		13v,7c	6v,14c
20		9v,10c,1n	5v,9c,6n
30		4v,11c,5n	1v,7c,12n
T30		20v	20v

Anexo 8. Frecuencia para la coloración de plantas debido al efecto de TIBA (0,5,10,20,40 mg/l), durante 6 meses de almacenamiento a 15°C

	'Currare'		'Gran Enano'
<i>1 mes</i>	v=verde	c=clorótica	n=necrosada
5		19v,1c	18v,2c
10		18v,2c	18v,2c
20		14v,3c,3n	15v,5c
40		13v,5c,2n	12v,8c
00		20v	18v,2c
<i>2 mes</i>			
5		19v,1c	18v,2c
10		18v,2c	18v,2c
20		14v,3c,3n	11v,8c,1n
40		11a,5b,4n	8v,5c,7n
00		20v	18v,2c
<i>3 mes</i>			
5		20v,	18v,2c
10		17v,3c	18v,2c
20		14v,3c,3n	8v,11c,1n
40		3v,7c,10n	2c,6c,12n
00		20v	18v,2c
<i>4 mes</i>			
5		20v,	18v,2c
10		15v,5c	18v,2c
20		10v,7c,3n	2v,9c,9n
40		2v,7c,11n	2v,6c,12n
00		20v	18v,2c
<i>5 mes</i>			
5		20v	18v,2c
10		14v,6c	17a,2c
20		10v,7b,3c	2v,9c,9n
40		2v,7c,11n	2v,6c,12n
00		20v	18v,2c
<i>6 mes</i>			
5		20v	18v,2c
10		14v,6c	16v,4c
20		10v,7c,3n	2v,4c,14n
40		2v,6c,12n	2v,4c,14n
00		20v	18v,2c

Anexo 9. Análisis de varianza para el recuento de estomas en el haz y envés de plantas in vitro, de dos variantes de plátano 'Currare' comparados con el testigo.

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
<i>Haz</i>				
Variante	2	7.783	2.12	0.1394 ^{ns}
Error	27	3.669		
Total	29	3.953		
<i>Envés</i>				
Variante	2	51.851	2.29	0.1205 ^{ns}
Error	27	22.680		
Total	29			
C.V. (Haz)=20.95			C.V. (Envés)=14.80	

Anexo 10. Análisis de varianza para el recuento de estomas en el haz y el envés de plantas en invernadero, de dos variantes de Plátano 'Currare' comparados con un testigo.

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
<i>Ház</i>				
Variante	2	9.607	2.36	0.1138 ^{ns}
Error	27	4.0738		
Total	29			
<i>Envés</i>				
Variante	2	42.43033	1.33	0.2818 ^{ns}
Error	27	31.9538		
Total	29			
C.V. (Ház)=25.16			C.V. (Envés)=16.1908	

Anexo 11. Análisis de varianza para el largo(μm) de estomas en el haz y el envés de plantas in vitro de dos variantes de plátano 'Currare' comparados con un testigo.

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
<i>Ház</i>				
variante	2	2.5076	1.82	0.1811 ^{ns}
Error	27	1.3766		
Total	29			
<i>Envés</i>				
Variante	2	0.2688	0.24	0.7905 ^{ns}
Error	27	1.1335		
Total	29			
C.V. (Ház)=3.55		C.V. (Envés)=3.25		

Anexo 12. Análisis de varianza para el ancho(μm) de estomas en el haz y el envés de plantas en in vitro de dos variantes de Plátano 'Currare', comparados con un testigo.

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
<i>Ház</i>				
Variante	2	1.0176	1.25	0.3028 ^{ns}
Error	27	0.8147		
Total	29			
<i>Envés</i>				
Variante	2	0.8619	2.20	0.1306 ^{ns}
Error	27	0.3923		
Total	29			
C.V. (Ház)=3.86		C.V. (Envés)=2.72		

Anexo 13. Análisis de varianza para el largo(μm) de estomas en el haz y el envés de plantas en invernadero de dos variantes de plátano 'Currare', comparados con un testigo.

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
<i>Ház</i>				
variante	2	2.4804	1.95	0.1618 ^{ns}
Error	27	1.2721		
Total	29			
<i>Envés</i>				
Variante	2	1.8275	2.19	0.1309 ^{ns}
Error	27	0.8327		
Total	29			
C.V. (Ház)=3.2824		C.V. (Envés)=2.7491		

Anexo 14. Análisis de varianza para el ancho(μm) de estomas en el haz y el envés de plantas en invernadero de dos variantes de plátano 'Currare' comparados con un testigo.

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
<i>Ház</i>				
Variante	2	1.033	1.96	0.1599 ^{ns}
Error	27	0.5263		
Total	29			
<i>Envés</i>				
Variante	2	1.0761	1.80	0.1849 ^{ns}
Error	27	0.5948		
Total	29			
C.V. (Ház)=3.1489		C.V. (Envés)=3.4159		

Anexo 15 Análisis de varianza para tasa de multiplicación de variantes a nivel in vitro

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
Variante	2	6.713	1.91	0.1576**
Error	54	3.51		
Total	56			

C.V.=92.86

Anexo 16. Análisis de varianza para la variable altura de variantes de plátano 'Carrare' a nivel de invernadero evaluadas durante 3 meses

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
Variante	2	381.5264	97.34	0.0001**
Rep(variante)=E _a	72	3.9193	2.33	0.0001**
Lectura	2	1956.8312	1161.14	0.0001**
Variante*Lectura	4	34.7150	20.60	0.0001**
Error =E _b	144	2.4505		
Total	224			

C.V.=12.67

Anexo 17. Análisis de varianza para el diámetro del seudotallo de dos variantes de plátano 'Currare' comparados con un testigo, evaluados durante 3 meses en invernadero

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
Variante	2	0.0393	1.16	0.3202 ^{ns}
Rep(variante)=E _a	72	0.03405	4.21	0.0001**
Lectura	2	7.4207	918.12	0.0001**
Variante*Lectura	4	0.01688	2.09	0.0852 ^{ns}
Error =E _b	144	0.0080		
Total	224			

C.V.=9.2704

Anexo 18. Análisis de varianza para el largo de la lámina de la hoja de dos variantes de plátano 'Currare' comparados con un testigo, evaluados durante 3 meses en invernadero

F.V.	gl	C.M.	Valor	FPr > F
Variante	2	132.3241	17.05	0.0001**
Rep(variante)=E _a	72	7.7612	3.58	0.0001**
Lectura	2	1282.9969	590.99	0.0001**
Variante*Lectura	4	5.8996	2.72	0.0321*
Error =E _b	144	2.1709		
Total	224			

C.V.=8.4131

Anexo 19. Análisis de varianza para el ancho de la lámina de la hoja de dos variantes de plátano 'Currare' comparados con un testigo, evaluados durante 3 meses en invernadero

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
Variante	2	21.5316	11.68	0.0001**
Rep(variante)=E _a	72	1.8429	6.04	0.0001**
Lectura	2	130.4570	427.79	0.0001**
Variante*Lectura	4	0.6395	2.10	0.0842n=
Error =E _b	144	0.3049		
Total	224			

C.V.=9.8377

Anexo 20. Análisis de varianza para el índice foliar de dos variantes de plátano 'Currare' comparados con un testigo, evaluados durante 3 meses en invernadero

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
Variante	2	12.07186	97.70	0.0001**
Rep(variante)=E _a	72	0.12356	2.89	0.0001**
Lectura	2	0.00380	0.09	0.9147n=
Variante*Lectura	4	0.25915	6.07	0.0002**
Error =E _b	144	0.04269		
Total	224			

C.V.=6.5183

Anexo 21. Análisis de varianza para la longitud del peciolo en dos variantes de plátano 'Currare' comparados con un testigo, evaluados durante 3 meses en invernadero

F.V.	gl	C.M.	Valor F	Pr > F
Variante	2	34.2236	90.00	0.0001**
Rep(variante)=E _a	72	0.3824	2.06	0.0001**
Lectura	2	166.0273	897.50	0.0001**
Variante*Lectura	4	3.6383	19.67	0.0001**
Error =E _b	144	0.1849		
Total	224			

C.V.=13.31

Anexo 22. Análisis de varianza para el número de hojas de dos variantes de plátano 'Currare' comparados con un testigo, evaluados durante 3 meses en invernadero

F.V.	gl	C.M.	Valor	FPr > F
Variante	2	10.4117	11.94	0.0001**
Rep(variante)=E _a	72	0.8722	1.36	0.069n=
Lectura	2	4.5121	7.03	0.0012**
Variante*Lectura	4	2.3307	3.63	0.0075**
Error =E _b	144	0.6415		
Total	224			

C.V.=11.56

Anexo 23. Análisis de varianza para el ángulo de inserción de dos variantes de plátano 'Currare' comparados con un testigo, evaluados durante 3 meses en invernadero

F.V.	gl	C.M.	Valor	FPr > F
Variante	2	1925.2639	102.06	0.0001**
Rep(variante)=E _a	72	18.7284	29.00	0.0001**
Lectura	1	165.9969	257.06	0.0001**
Variante*Lectura	2	5.5377	8.58	0.0005**
Error =E _b	72	0.6457		
Total	149			

C.V.=3.2212

Anexo 24. Prueba de Dunnett para comparar las medias en diferentes características morfológicas de los variantes gigante y enano frente al testigo con un Alfa de 0.05 y un valor Dunnetts= 2.257

F.V.	Lim.inf.	Dif.de medias	Lim.sup.	C.M.E
<i>Altura</i>				
Gigante*Testigo	2.5681	3.2978	4.0274 ***	3.9193
Enano*Testigo	-1.4943	-0.9957	0.4971 ***	
<i>Diámetro tallo</i>				
Gigante*Testigo	-0.08849	-0.02048	0.04753**	0.03405
Enano*Testigo	0.11455	0.04677	0.02101**	
<i>Largo hoja</i>				
Gigante*Testigo	1.0083	2.0351	3.0619***	7.76127
Enano*Testigo	-1.3693	-0.3460	0.6773 **	
<i>Ancho hoja</i>				
Gigante*Testigo	-1.3430	-0.8436	-0.3423***	1.84292
Enano*Testigo	-1.4943	-0.9957	0.4971***	
<i>Indice foliar</i>				
Gigante*Testigo	0.71954	0.79492	0.87030***	0.042694
Enano*Testigo	0.41668	0.49206	0.56743 ***	
<i>Largo peciolo</i>				
Gigante*Testigo	0.8924	1.1196	1.3469 ***	0.38024
Enano*Testigo	-0.2695	-0.0430	0.1835.**	
<i>Número hojas</i>				
Gigante*Testigo	0.2585	0.0857	0.4299**	0.87225
Enano*Testigo	0.3459	0.6889	1.0320***	

Anexo 25. Medios de cultivo utilizados en las diferentes etapas de la micropropagación en Musáceas.

<i>Etapas de iniciación</i>	
<u>Componentes</u>	<u>Cantidad por litro</u>
	<u>en peso(mg)</u> <u>Molaridad</u>
NH ₄ NO ₃	1650 20.6 mmol
KNO ₃	1900 18.8 mmol
CaCl ₂ . 2H ₂ O	440 2.99 mmol
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370 1.50 mmol
KH ₂ PO ₄	170 1.25 mmol
H ₃ BO ₄	6.2 100 μmol
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22.3 100 μmol
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8.6 29.9 μmol
KI	0.86 5.00 μmol
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.25 1.03 μmol
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.025 0.100 μmol
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025 0.105 μmol
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.8 100. μmol
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	37.4 100 μmol
Sacarosa	30000. 87.6 mmol
M-inositol	100 555.00 μmol
Acido nicotínico	0.5 4.09 μmol
Piridoxina-HCl	0.5 2.43 μmol
Tiamina-HCl	0.1 0.296 μmol
Glicina	2.0 26.6 μmol
BAP	1.0 4.44 μmol
Bacto-agar(difco)	7000.00

Etapas de multiplicación:

Se utilizó el mismo medio, suplementado con 4 mg/l de BAP

Etapas de desarrollo

Se utilizó el mismo medio, sin regulador de crecimiento(BAP), más 2mg/l de gelrite en lugar de agar.