



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la
Producción**

“Obtención de Multimeristemas y Callos de diferentes variedades de
Banano y Plátano (*Musa spp.*) a partir de ‘Meristemas Apicales’ y
‘Scalps’

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

INGENIERO AGROPECUARIO

Presentada por:

Nathalie Victoria Ortega Pérez

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2010

AGRADECIMIENTO

A DIOS por estar siempre a mi lado, a SENACYT y todo el personal del CIBE que de una u otra manera apoyaron en la realización de éste trabajo especialmente al personal del Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Bioestadística y Dirección del Centro, por su invaluable ayuda.

DEDICATORIA

A MI MADRE por ser la luz que
guía mi camino con su infinito
Amor.

A MI PADRE por su apoyo.

A MIS HERMANAS por ser mis
motivos de superación y ejemplo
de ellas.

A MI CORAZÓN por motivarme y
enseñarme a luchar día a día con
mucho Amor.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ph.D. Efrén Santos O.
DELEGADO DEL DECANO DE LA FIMCP
PRESIDENTE

Msc. Sofía Korneva B.
DIRECTOR DE TESIS

Msc. Omar Ruiz B.
VOCAL PRINCIPAL

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).

Nathalie Victoria Ortega Pérez

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en las instalaciones del CIBE - ESPOL (Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador) en el laboratorio de Cultivo de Tejidos, con el apoyo de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) a través del Proyecto N° PIC – 08 – 0000300.

Ante la necesidad de encontrar soluciones contra plagas, enfermedades y diversos factores ambientales en los cultivos de banano y plátano (*Musa spp.*), los investigadores utilizan técnicas biotecnológicas como la transformación genética en plantas para crear nuevas variedades. Para lograrlo, es primordial disponer de suspensiones celulares embriogénicas que posean un alto coeficiente de regeneración en plantas para de esta manera evitar la formación de quimeras. El objetivo principal del presente estudio fue determinar si existen diferencias entre los métodos de scalps y meristemo apical en el desarrollo de callos para las diferentes variedades de banano y plátano (*Musa spp.*).

Para ello los cormos introducidos de campo de las diferentes variedades de banano y plátano (*Musa spp.*) fueron procesados en el laboratorio para la obtención de vitroplantas pasando por etapas de desinfección, establecimiento

de cultivo y multiplicación. Se evaluaron dos tratamientos y se realizó el conteo de hijuelos.

A partir de las vitroplantas de las diferentes variedades en estudio, se realizó el método de scalps, sometiendo a los explantes en seis tratamientos bajo oscuridad por cada variedad hasta obtener los multimeristemas, y a partir de éstos inducir su formación a callos. Los callos obtenidos en los medios de cultivo sólidos para su inducción, fueron sembrados en los mismos medios de cultivo líquidos para su desagregación y división.

Los meristemas apicales fueron extraídos de vitroplantas y sembrados en medio de cultivo para inducción a callo H1 ($1\text{mg} / \text{L}^{-1}$) de diferente consistencia (sólido y líquido).

Las células obtenidas mediante la desagregación de los callos, fueron observadas bajo estereomicroscopio.

El modelo experimental utilizado para el establecimiento de los ensayos de scalps y meristemo apical fue un diseño completamente al azar, los que fueron analizados a través de la prueba no paramétrica de Kurskall – Wallis. Para el establecimiento de cultivos *in vitro* se utilizó la prueba de diferencia de

proporciones. Se generaron tablas en Excel 2007 de porcentaje de hijuelos, desarrollo de subdivisiones de plantas, multimeristemas callos y fenolización.

Para el establecimiento de cultivos, la variedad Morado (AAA) produjo el 100% de hijuelos con un índice de multiplicación de un hijuelo por planta y la variedad Barraganete (AAB) el 91.4% con un índice de multiplicación de 0.91 hijuelos por planta, ambas en tratamiento T2 en medio de cultivo Bn (4mg/L^{-1}) con hormonas.

En el método de scalps las variedades de Barraganete y Williams (AAA) presentaron mayor desarrollo de scalps con más del 80% en medio de cultivo TDZ, mientras que Orito (AA), Morado, Williams y Calcutta – 4 (AA) lo hicieron en medio de cultivo P4 con más del 50%.

En ambos métodos de scalps y meristemo apical la inducción de callos a partir de estos dos explantes es apropiada en medio de cultivo H1 tanto sólido como líquido, así tenemos que en las variedades Orito, Barraganete y Morado el porcentaje de callos está entre el 16 – 56%. En las variedades controles los callos se forman en medio de cultivo FM1 y ZZ que van del 20 – 32%.

ÍNDICE GENERAL

	Págs.
RESUMEN _____	VI
ÍNDICE GENERAL _____	IX
ABREVIATURAS _____	XIII
SIMBOLOGÍA _____	XV
ÍNDICE DE FIGURAS _____	XVI
ÍNDICE DE TABLAS _____	XVIII
INTRODUCCIÓN _____	1
CAPÍTULO 1	
1. REVISIÓN DE LITERATURA _____	5
1.1 Características generales de los cultivo de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>) _____	5
1.1.1 Origen _____	6
1.1.2 Distribución _____	7
1.1.3 Importancia económica _____	9
1.1.4 Morfología y fisiología de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>) _____	11
1.1.5 Plagas y enfermedades más comunes de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>) _____	13

1.2	Biotecnología_____	15
	1.2.1 Antecedentes_____	16
1.3	Cultivo de tejidos vegetales_____	17
	1.3.1 Técnicas de cultivo de tejidos vegetales_____	17
	1.3.1.1 Cultivo de meristemos apicales_____	17
	1.3.1.2 Cultivo de scalps o multimeristemos_____	17
	1.3.1.3 Cultivo de callos_____	18
	1.3.1.4 Cultivo de células_____	20
	1.3.1.5 Cultivo de embrioides_____	21
	1.3.2 Área de aplicación del cultivo de tejido vegetal_____	22
	1.3.2.1 Obtención de plantas libres de enfermedades sistémicas_____	22
	1.3.2.2 Multiplicación acelerada <i>in vitro</i> de cultivos de importancia económica_____	24
	1.3.2.3 Mejora genética de cultivos_____	25
1.4	Preparación de materiales, reactivos y medios de cultivo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos_____	27
	1.4.1 Limpieza y esterilización de materiales_____	27
	1.4.1.1 Cristalería y recipientes plásticos_____	27
	1.4.1.2 Cristalería para elaboración de medios de	

	Cultivo_____	27
1.4.1.3	Otros materiales_____	28
1.4.2	Limpieza y desinfección de la Cámara de Flujo Laminar Horizontal_____	28
1.4.3	Preparación de agua destilada _____	29
1.4.4	Elaboración de Soluciones Madre_____	29
1.4.5	Preparación de Medios de Cultivo_____	30

CAPÍTULO 2

2.	MATERIALES Y MÉTODOS_____	32
2.1	FASE 1 Introducción y establecimiento de cultivos de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>)_____	32
2.2	FASE 2 Obtención de callos_____	35
2.2.1	Método de `scalps` o multimeristemas_____	35
2.2.2	Método de `meristemo apical` _____	39

CAPÍTULO 3

3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN_____	42
3.1	FASE 1 Introducción y establecimiento de cultivos de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>)_____	42

3.2	FASE 2 Obtención de callos	48
3.2.1	Método de `scalps`	48
3.2.2	Método de `meristemo apical`	65

CAPÍTULO 4

4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	73
-----------	---------------------------------------	-----------

BIBLIOGRAFÍA	75
---------------------	-----------

APÉNDICES	82
------------------	-----------

ABREVIATURAS

H ₃ BO ₃	Ácido Bórico
HCl	Ácido Clorhídrico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AIA	Ácido Indol acético
PCPA	Ácido Para – cloro - fenoxiacético
AEBE	Asociación de Exportadores de Bananos del Ecuador
at	Atmósfera
cm	Centímetro
CaCl ₂ · 2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado
CoCl ₂ · 6H ₂ O	Cloruro de cobalto hexahidratado
d.C	Después de Cristo
2, 4 – D	2, 4 Dicloro Fenoxiacético
O ₂	Dioxígeno
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	Disodium dihydrogen ethylenediaminetetraacetate
spp.	Especies
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio
g	Gramo
KOH	Hidróxido de Potasio
KI	Ioduro de potasio
IM	Índice de multiplicación
kg	Kilogramos
L	Litros
mg	Milígramo
mm	Milímetro
min	Minuto
m	Metro
MS	Murashigue y Skoog
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	Molibdato de sodio dihidratado
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio

KNO ₃	Nitrato de potasio
pH	Potencial Hidrógeno
r.p.m.	Radianes por Minuto
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
FeSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado
MgSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado
MnSO ₄ · 4H ₂ O	Sulfato de manganeso tetrahidratado
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado
TDZ	(thidiazuron) 1-phenyl-3(1, 2,3-thiadiazol-5-YL) (Úrea)
Ton	Toneladas
2, 4,5 – T	2, 4, 5 Tricloro Fenoxiacético

SIMBOLOGÍA

°C	Grados Centígrados
%	Porcentaje
°	Grados
μS/cm	MicroSiemens/cm
dS/m	DeciSiemens/m

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1 Origen y distribución de los plátanos y bananos_____	7
Figura 1.2 Exportaciones de banano y plátano ecuatoriano_____	11
Figura 1.3 Daño en hoja ocasionada por Sigatoka Negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i> , Morellet)_____	14
Figura 1.4 Cultivo de embrioides de banano_____	22
Figura 3.1 Índice de multiplicación de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo (ITC – K) sin hormonas_____	43
Figura 3.2 Índice de multiplicación de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo (BN) con hormonas_____	45
Figura 3.3 Medias del desarrollo de explantes (subdivisiones, scalps y callos) bajo seis tratamientos en la variedad Orito (AA)_____	49
Figura 3.4 Medias del desarrollo de explantes (subdivisiones, scalps y callos) bajo seis tratamientos en la variedad Barraganete (AAB)_____	50
Figura 3.5 Medias del desarrollo de explantes (subdivisiones, scalps y callos) bajo seis tratamientos en la variedad Morado (AAA)_____	51
Figura 3.6 Medias del desarrollo de explantes (subdivisiones, scalps y callos) bajo seis tratamientos en la variedad Williams (AAA)_____	53
Figura 3.7 Medias del desarrollo de explantes (subdivisiones, scalps y callos) bajo seis tratamientos en la variedad Calcutta – 4 (AA)_____	54
Figura 3.8 Desarrollo de scalps en dos medios de cultivo utilizados en las diferentes variedades de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>) en estudio_____	57
Figura 3.9 Proporción de la inducción del desarrollo de scalps a callos por variedad en diferentes medios de cultivo: FM1, ZZ y H1 provenientes	

del medio TDZ	58
Figura 3.10 Proporción de la inducción del desarrollo de scalps a callos por variedad en diferentes medios de cultivo: FM1, ZZ y H1 provenientes del medio P4	59
Figura 3.11 Desarrollo de callos de las diferentes variedades de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>) en estudio	62
Figura 3.12 Barras de proporción de las variedades en estudio en medio de cultivo H1 (sólido y líquido)	65
Figura 3.13 Desarrollo de callos de las diferentes variedades de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>) en estudio bajo dos tratamientos	68
Figura 3.14 Observación de células de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>) en estudio bajo estéreo microscopio	70
Figura 3.15 Observación de embrioides de Barragante (AAB) en medio de cultivo sin hormonas	71

ÍNDICE DE TABLAS

	Págs.
Tabla 1 Soluciones Madre_____	29
Tabla 2 Análisis estadístico de los datos de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo ITC – K sin hormonas_____	43
Tabla 3 Análisis estadístico de los datos de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo BN (4mg/L ⁻¹) con hormonas_____	45
Tabla 4 Porcentaje de explantes (subdivisiones de plantas, scalps y callos) en las variedades de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>) en estudio en medio de cultivo TDZ y P4_____	56
Tabla 5 Porcentaje del desarrollo de callos por variedad a partir de scalps_____	61
Tabla 6 Porcentaje de fenolización de los explantes (subdivisiones de plantas, scalps y callos) en las variedades de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>) en estudio en seis diferentes tratamientos_____	63
Tabla 7 Porcentaje del desarrollo de callos y fenolización en las variedades de banano y plátano (<i>Musa spp.</i>) en estudio bajo dos tratamientos_____	67

INTRODUCCIÓN

La biotecnología es "*toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos*" (28).

Uno de los ejemplos de uso de biotecnología por el hombre es la propagación masiva de plántulas *in vitro* de cultivos de mayor importancia económica para el país (28).

Los cambios climáticos severos experimentados en las últimas décadas y los ataques de numerosas plagas y enfermedades, incluyendo la Sigatoka Negra (***Mycosphaella fijiensis* Morellet**), han afectado los rendimientos de banano y plátano en el Ecuador¹.

El uso de pesticidas y químicos para contrarrestar los efectos de dicha enfermedad, conducen a menor rentabilidad en la producción y elevan la contaminación ambiental con riesgos sobre la biodiversidad y salud humana¹.

¹ KORNEVA S.; MARIBONA R. H.; et al., Comportamiento de variedades de banco Germoplasma (*Musa spp.*) ante propagación *in vitro* y Crioconservación (-196°C) (Poster, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2009).

La obtención de nuevas variedades resistentes a la Sigatoka Negra sería la mejor solución al problema, sin embargo, por la vía convencional este proceso es lento y difícil. La transformación genética ha sido adoptada como un método para mejorar o introducir nuevas características y para entender el funcionamiento de las plantas (29).

Los programas de ingeniería genética dirigidos a la producción de plantas de banano con incrementada resistencia a las principales plagas y enfermedades, cuentan con cultivo de células de una alta capacidad de regeneración. Se ha demostrado que las suspensiones celulares embriogénicas representan el material celular más adecuado para éstos propósitos².

² KORNEVA S.; MARIBONA R. H.; et al., Establecimiento de las Suspensiones Celulares Embriogénicas de la variedad Calcutta – 4 (AA) resistente a la Sigatoka Negra y su neoformación en plantas (Poster, Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2008)

Este trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), edificio PROTAL de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, campus Gustavo Galindo, ubicado en el km 30,5 de la vía Perimetral en la ciudad de Guayaquil, con el apoyo de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) a través del Proyecto N° PIC – 08 – 0000300.

El trabajo de investigación se basó en tres metodologías: introducción *in vitro* de cultivos de interés y su propagación acelerada de plantas, método de scalps y método de meristemo apical con diferentes tratamientos en cada uno de ellos para las variedades propuestas en este estudio con la finalidad de obtener los cultivos establecidos y callos a partir de estos.

El objeto de esta investigación está orientada a la aprobación de la siguiente hipótesis:

“Existen diferencias entre los métodos de scalps y meristemo apical en cuanto al desarrollo y obtención de callos para las diferentes variedades de banano y plátano (*Musa spp.*) en estudio”.

Planteada esta hipótesis, el objetivo general en esta investigación fue:

1. Obtener callos a partir de multimeristemas o scalps y de meristemas apicales de las diferentes variedades de banano y plátano (***Musa spp.***): Orito (AA), Barraganete (AAB), Dominico (AAB), Morado (AAA), Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA)

Para el desarrollo de dicho objetivo, se establecieron los siguientes objetivos específicos por variedad en estudio:

1. Introducir de campo y establecer *in vitro* los cultivos.
2. Analizar y evaluar el desarrollo de hijuelos en medio de cultivo sin y con hormonas.
3. Ejecutar los métodos de scalps y meristemo apical a partir de las plántulas establecidas *in vitro* empleando los tratamientos establecidos para cada uno.
4. Analizar y evaluar el desarrollo de multimeristemas y callos en los diferentes métodos y tratamientos establecidos para este trabajo.

Los datos de las evaluaciones obtenidas fueron sometidos a los análisis estadísticos correspondientes para comparar y determinar cuál de los métodos de obtención de callos (scalps y meristemo apical) es eficiente en cuanto a calidad de callos y tiempo de formación de estos.

CAPÍTULO 1

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Características generales de los cultivos de banano y plátano (*Musa spp.*)

En la sección *Eumusa* se encontraban las especies *Musa acuminata* y *M. balbisiana* que fueron los progenitores principales de los cultivares de musáceas comestibles. *M. acuminata* es una especie diploide AA, con fertilidad femenina y masculina que produce frutos con muchas semillas. Por su parte, *M. balbisiana* también es un diploide de constitución genómica BB, con fertilidad femenina y masculina, frutos con muchas semillas y más estable, desde el punto de vista genético que *M. acuminata* (16).

Estas especies originaron, por mutaciones o hibridaciones, a los cultivares que hoy en día se siembran alrededor del mundo; de este manera se formaron cultivares de los grupos AA, AB, AAA, AAB, ABB, AAAA, AAAB, AABB, ABBB (16).

La triploidía fue otro paso importante en la evolución de las musáceas comestibles; se piensa que ésta surgió luego de la fertilización de células-huevo diploides viables (formadas por fallas en la meiosis en la segunda división) con polen haploide. Los cultivares triploides se encuentran en los grupos genómicos AAA, AAB y ABB, son plantas más grandes y más fuertes que los diploides, con frutos de mayor tamaño. Los diploides generalmente pueden ser distinguidos de los triploides por sus pseudotallos más esbeltos y hojas más erectas (16).

1.1.1 Origen

El banano y plátano tienen su origen en Asia meridional, siendo conocidos en el Mediterráneo desde el año 650 d.C. La especie llegó a Canarias en el siglo XV y desde allí fue llevado a América en el año 1516. El cultivo comercial se inicia en Canarias a finales del siglo XIX y principios del siglo

XX. El plátano macho y el bananito son propios del sudoeste asiático; su cultivo se ha extendido a muchas regiones de Centroamérica y Sudamérica, así como de África subtropical; constituyendo la base de la alimentación de muchas regiones tropicales (FIGURA 1.1) (1).



FIGURA 1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS PLÁTANOS Y BANANOS

Fuente: Antecedentes del banano y/o plátano
<http://www.monografias.com/trabajos73/antecedentes-banano-platano/antecedentes-banano-platano.shtml> 2009

1.1.2 Distribución

El banano y plátano son reconocidos como el cuarto cultivo de frutas más importante del mundo. Los países latinoamericanos y del Caribe producen los bananos y plátanos que entran en el comercio internacional (1).

En nuestro país el cultivo de banano se halla distribuido en todo el Litoral Ecuatoriano. El Ex - Programa Nacional del Banano que controlaba y fomentaba el cultivo en nuestro país distribuyó las áreas bananeras de la siguiente forma:

1. **ZONA NORTE.-** ubicada en la provincia de Esmeraldas y Pichincha, abarca las zonas bananeras de Quinindé, Esmeraldas y Santo Domingo de los Colorados (18).
2. **ZONA CENTRAL.-** abarca las áreas bananeras de Quevedo, provincia de los Ríos; La Maná, provincia del Cotopaxi y Velasco Ibarra en la provincia del Guayas (18).
3. **ZONA SUBCENTRAL.-** localizada en la provincia de Los Ríos, comprende las áreas localizadas en Pueblo Viejo, Urdaneta, Ventanas y el Cantón Balzar en la provincia del Guayas (18).
4. **ZONA ORIENTAL - MILAGRO.-** se extiende desde Naranjito, Milagro hasta Yaguachi en la provincia del Guayas (18).

5. ZONA ORIENTAL - EL TRIUNFO.- situada en la provincia del Guayas con incumbencia en el Cantón El Triunfo, La Troncal en la provincia del Cañar y Santa Ana en la provincia del Azuay (18).

6. ZONA NARANJAL.- ocupa las localidades de Naranjal, Balao y Tenguel (18).

7. ZONA SUR - MACHALA.- ubicada en la provincia de El Oro, comprende los Cantones: Santa Rosa, Arenillas, Guabo, Machala y Pasaje (18).

En cambio el cultivo de plátano se encuentra distribuido principalmente en la provincia de Manabí, en la zona del Carmen; en Santo Domingo de los Colorados, Pichincha, Oriente, Esmeraldas, Guayas y Los Ríos; el cual se sigue extendiendo a otras provincias (19).

1.1.3 Importancia Económica

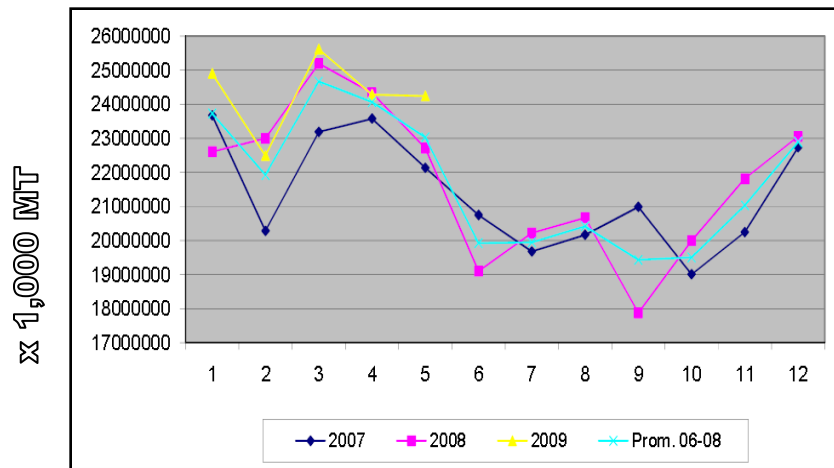
Los bananos y plátanos son consumidos extensivamente en los trópicos, apreciados por su sabor, gran valor nutritivo (ver APÉNDICE A) y por su disponibilidad durante todo el año.

Tan solo en el centro y oeste de África constituyen la fuente principal de alimentación de 270 millones de personas (2).

A nivel de país el banano se ha incrementado a más de 220.000 has, generando nuevas tasas de empleos para el agricultor ecuatoriano (2).

Según reportes de la Asociación de Exportadores de Bananos del Ecuador (AEBE) a la semana 30 del año 2009, el país exportó 158'935.783 cajas, a un promedio semanal de 5'978,590 cajas (FIGURA 1.2) (6).

La Unión Europea sigue siendo el principal mercado regulado de exportación en el Ecuador, el cual participa en el 35% (67 millones de cajas 2008) de las importaciones de banano para estos países. Al igual hacia el mercado de Rusia y Europa del Este, para el 2008, según cifras oficiales, se exportaron 127 millones de cajas. En total Europa en el 2008 importó de Ecuador 194 millones de cajas (6).



Tiempo en meses y años

FIGURA 1.2 EXPORTACIONES DE BANANO Y PLÁTANO ECUATORIANO

Fuente: AEBE (ExportMen_Jun09.pdf) Cifras estadísticas Manifiestos y Sopisco News. Bananaexport Lcdo. Kleber Exkart R. 2009

1.1.4 Morfología y fisiología de banano y plátano (*Musa spp.*)

Musa spp. es una planta herbácea, monocotiledónea de la cuál surgen varios individuos conocidos como madre, hija y nieta.

Raíz.- superficial, distribuida radialmente en los primeros 30 cm. del suelo y alcanza un largo de 1,5 a 2 metros (3, 4).

Rizoma, cormo o cepa.- es una yema vegetativa que sale de la planta madre, sufre un cambio anatómico y morfológico de los tejidos y al crecer diametralmente forma el rizoma,

alcanzando una considerable altura. Da origen a hojas (cicatrices foliares) y a yemas, posee dos zonas bien definidas: la parte externa o cortical y la interna de donde emergen raíces y brotes. En el centro se encuentra el meristemo vegetativo que forma el sistema aéreo (vainas y limbos foliares) y finalmente forma la inflorescencia. Es utilizado como semilla vegetativa (3, 4).

Hojas.- poseen diferentes formas y sirven para estimar las etapas morfológicas y fenológicas del cultivo. Se distinguen tres partes importantes: base o vaina foliar (forma el pseudotallo), pseudopécíolo y lámina foliar (3, 4).

- Índice de área foliar: 1.5 - 2 (banano 3 - 3.5), no cambia con distancia de siembra.

Tallo falso o pseudotallo.- soporta a toda la parte aérea de la planta.

Inflorescencia.- racimo (fruto partenocárpico), posee flores hermafroditas y flores femeninas, en algunos clones las flores

masculinas caen. El número de flores femeninas y del tamaño del racimo depende del clon y la nutrición (3, 4).

Fruto.- se desarrolla de los ovarios de las flores pistiladas por el aumento del volumen de las tres celdas del ovario, opuestas al eje central. Los ovarios abortan y salen al mismo tiempo los tejidos del pericarpio o cáscara y engrosan, la actividad de los canales de látex disminuye, cesando por completo cuando el fruto está maduro (3, 4). Ver apéndice B.

1.1.5 Plagas y enfermedades más comunes de banano y plátano (*Musa spp.*)

Picudo Negro (*Cosmopolitas sordidus*, Germ.): plaga del suelo cuyas larvas se alimentan del cormo, donde forman galerías que originan reducción del peso y calidad de la fruta. Pequeños insectos que miden de 10 - 15 milímetros, viven libremente encontrándose en la base de la planta o asociados con los residuos del cultivo; es activo de noche y susceptible a la desecación, vuelan raramente y su diseminación ocurre principalmente a través del material de plantación infestado.

(Cormos). Se han registrado pérdidas del 40% en los cultivos (2).

Nematodos (*Radopholus similis*): destruyen el sistema radical de las plantas, lo cual refleja un raquitismo general y menor peso de los racimos. Propician la pudrición del cormo y el volcamiento de las plantas con racimo en desarrollo. Su diseminación es a través de cormos infestados y agua de riego (2). Ver apéndice C

Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morellet): enfermedad foliar más importante del banano y plátano a nivel mundial, ocasiona pérdidas en la producción hasta un 50% e incremento en los costos de producción, debido a su control basado en el uso de agroquímicos.



FIGURA 1.3 DAÑO EN HOJA OCACIONADA POR SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis*, Morellet)

Fuente: sian.inia.gob.ve

Se caracteriza por manchas en hojas que destruyen parcial o totalmente el área fotosintética (FIGURA 1.3). Puede atacar plantas de cualquier edad, en especial aquellas que están próximas a la floración o durante el periodo de floración a cosecha (2).

Los factores de suelo y el mal manejo del cultivo (mala nutrición, mal drenaje, etc.) favorecen el ataque y permanencia de la enfermedad. Se disemina de una región a otra, mediante el uso de hojas infectadas para proteger a los racimos durante su transporte a los centros de consumo, de hijuelos para establecer nuevas plantaciones. También el viento y el agua de lluvia pueden transportar al hongo de una plantación a otra (2).

1.2 Biotecnología

La biotecnología es un conjunto de técnicas que utilizan organismos vivos, sus partes o compuestos, para mejorar procesos y obtener o modificar productos con valor agregado para el hombre. Con el transcurso del tiempo, las definiciones de biotecnología se han modificado, de acuerdo con el conocimiento

que el hombre adquiere sobre los seres vivos, dando lugar a una biotecnología tradicional, una clásica y una moderna (21).

1.2.1 Antecedentes

La biotecnología tradicional comienza cuando el hombre aprovechando los principios de la fermentación utilizó bacterias y levaduras para producir cerveza, vino, queso o yogurt. Por su parte, la biotecnología clásica nace con el desarrollo y la aplicación del cultivo de tejidos in vitro. Dándose en ese momento un conocimiento de los organismos vivos involucrados en los procesos biológicos y de los mecanismos para controlarlos (21).

Con la biotecnología moderna se desarrollan las herramientas que permiten el surgimiento de los organismos genéticamente modificados. Se diferencia de las anteriores biotecnologías porque el ser humano tiene a su alcance herramientas y conocimientos necesarios para trabajar las características de los seres vivos a nivel molecular, lo cual le permite transferir información genética de un organismo a otro, superando las barreras naturales (21).

1.3 Cultivo de Tejidos Vegetales

Consiste en cultivar, en condiciones asépticas, partes aisladas de una planta (células, tejidos u órganos) en un medio de cultivo sintético que contiene sales minerales, vitaminas, hormonas y otros aditivos capaces de sostener la vida y favorecer al desarrollo de una planta entera. La base de este método es la totipotencia celular (10).

1.3.1 Técnicas de cultivo de tejidos vegetales

Para este trabajo de investigación se puso en práctica las siguientes técnicas de cultivo de tejidos:

1.3.1.1 Cultivo de “Meristemos Apicales”

Un meristemo apical es la parte más joven de la planta, de rápido crecimiento, constante división y responsable del crecimiento longitudinal corporal de las plantas (10).

1.3.1.2 Cultivo de “Scalps” o “Multimeristemos”

Scalps o multimeristemos son aquellos explantes óptimos para la inducción de los cultivos

embriogénicos, obteniéndolos a través de tres cultivos sucesivos de los ápices meristemáticos en medio de cultivo MS modificado bajo condiciones de oscuridad (26).

1.3.1.3 Cultivo de Callos

Callo es el conjunto de células vegetales no diferenciadas en división, inducido por un balance hormonal específico entre auxinas y citoquininas (10).

Para obtenerlos se siembra un explante vegetal en un medio de cultivo bajo la acción de la hormona 2,4 – D; dicho explante comienza el crecimiento de una masa de células no diferenciadas, entre las cuales se puede encontrar células de distinto grado de organización y tejidos de distinta consistencia y color (10).

Los callos obtenidos pueden ser embriogénicos y no embriogénicos, dependiendo del material

inicial que se utilizó y en su mayor parte, del contenido del medio de cultivo (10).

Factores que influyen en el establecimiento de cultivo de callos

Material inicial (edad, partes de la planta, especie), establecimiento del cultivo, tamaño del explante, temporada, esterilización del explante, medio de cultivo (balance hormonal), temperatura (25 – 27 °C), luz, reguladores de crecimiento seleccionados (10).

Factores que provocan la deceleración del crecimiento de callos

Disminución de la cantidad de alimentos alrededor de los callos, producción de bioproductos tóxicos (fenolización), disminución de O₂ en el interior del callo, temperatura mayores de 35 °C, luz, concentración de hormonas (10).

Las hormonas para inducción de callo que comúnmente se utilizan son: 2, 4 – D; 2, 4, 5 T; PCPA; dalapon y picloram, las cuales generan los cambios de material genético y disminuyen la capacidad regenerativa de callos en plantas aumentando la aparición de variantes somaclonales (10).

1.3.1.4 Cultivo de Células

Pueden ser establecidos a partir de las células unitarias separadas enzimáticamente y grupos de células (agregados), mediante la desagregación de los callos establecidos de distintos órganos de las plantas (10).

Para establecer las suspensiones celulares se añaden 0,5 – 1 gr. de callos establecidos en 25 – 35 ml del medio de cultivo en frascos de 125 – 250 ml de volumen. Posteriormente se colocan en una zaranda rotatoria de 80 – 120 r.p.m. Si la agitación es suficiente para este tipo de células

en el medio de cultivo, se dividen las células y se forman los agregados celulares. La duración del primer ciclo del cultivo depende del material en agitación, que generalmente es de tres semanas (10).

1.3.1.5 Cultivo de embrioides

Es comúnmente conocido como la obtención de plantas por vía embriogénesis somática, es decir, la formación de un embrión a partir de una célula sin necesidad de fusión de gametos; fue descubierto en 1878 y descrito por primera vez en 1958 por Reinert.

Los embriones somáticos son estructuras con un eje radical – apical, no poseen la conexión con el tejido materno, son capaces de crecer y formar plantas completas (FIGURA 1.4) (10).

Es un método eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, el proceso puede ser automatizado, los embrioides pueden ser

encapsulados y servir como semilla artificial, debido a su naturaleza bipolar no requiere la fase de enraizamiento (10).

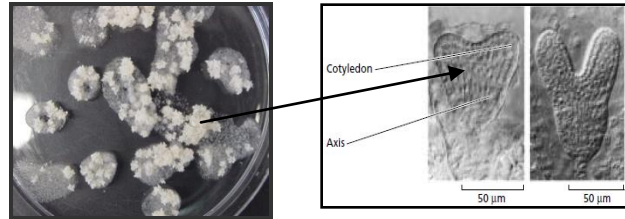


FIGURA 1.4 CULTIVO DE EMBRIOIDES DE BANANO

Fuente1: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

Fuente 2: Libro Plant Physiology pdf. From West and Harada 1993 photographs taken by K. Matsudaira Yee; courtesy of John Harada, © American Society of Plant Biologists, reprinted with permission

1.3.2 Área de aplicación del cultivo de tejido vegetal

1.3.2.1 Obtención de plantas libres de enfermedades

sistémicas

Para tener un mejor efecto en plantas libres de enfermedades se usa la combinación del cultivo de meristemo con los siguientes métodos.

Termoterapia

Se mantienen las plantas por un período variable de tiempo y temperatura (34° - 38°C desde una a

varias semanas), luego se realiza la extracción del meristema, se siembra en el medio de cultivo y se continúa con los pasos convencionales para su desarrollo (22).

Esta práctica ha resultado más efectiva en virus de partículas alargadas, y menos eficiente para virus poliédricos. En algunos casos las bajas temperaturas (5°C) seguidas del cultivo de meristemas fueron utilizadas con éxito para la eliminación de virus (22).

Quimioterapia

Con esta técnica se pueden aplicar los antibióticos directamente a los meristemas *in vitro*. Se los coloca en el medio del cultivo en concentraciones variables. Las plantas son mantenidas bajo la acción del antibiótico por largos períodos que incluyen varios subcultivos (22).

Un problema importante de los antibióticos es su fitotoxicidad, que a su vez depende de la dosis empleada y de la especie de planta utilizada (22).

Electroterapia

El método consiste en aplicar corriente eléctrica a yemas por un período variable de tiempo para obtener plantas libres de patógenos. El método también ha sido empleado para eliminar bacterias de caña de azúcar, *Potato leaf roll virus* de papa, *Dasheen mosaic virus* de aráceas y *Banana streak virus* de banana, entre otras. En este caso se obtuvo una eficiencia del 3 al 60%, dependiendo del cultivar y el patógeno (22).

1.3.2.2 Multiplicación acelerada *in vitro* de cultivos de importancia económica

Permite obtener grandes cantidades de plantas de alta calidad: genéticamente homogéneos, en corto período de tiempo, en área pequeña, en cualquier temporada del año, y libres de enfermedades.

Se la realiza por dos vías:

Organogénesis: es la formación de órganos (tallos, hojas, flores, etc.) hasta la regeneración de una planta completa (23). Esta técnica se basa en el cultivo de meristemo apical, pero puede adjuntarse las técnicas de yemas laterales, micro yemas, hojas primordiales, callos y otros (9).

Embriogénesis somática o asexuada: es la capacidad de las células embriogénicas de formar estructuras parecidas a embriones sexuales capaces de regenerar una planta completa (9).

1.3.2.3 Mejora genética de cultivos

La mejora genética de plantas se viene desarrollando desde tiempos ancestrales y con la curiosidad del hombre de obtener mejores productos en corto tiempo se hace uso de la biotecnología y sus ramas, como la ingeniería genética dentro de los laboratorios.

Entre uno de estos métodos se encuentran las suspensiones celulares embriogénicas, obtenidas de callos embriogénicos, las cuales constituyen una fuente para inducir cambio o transformación genética muchas veces mediante las fitohormonas que se incorporan en el medio de cultivo utilizado para su desarrollo. Estas transformaciones o variaciones somaclonales difieren de la planta seleccionada inicialmente, se obtienen nuevas variedades.

Otra forma de hacer transformación genética es utilizando técnicas moleculares insertando genes con las características deseadas en el individuo que se quiere mejorar.

1.4 Preparación de materiales, reactivos y medios de cultivo en el laboratorio de cultivo de tejidos

1.4.1 Limpieza y esterilización de materiales

1.4.1.1 Cristalería y recipientes plásticos:

- Desinfección de frascos con cloro al 5% (10).
- Limpieza de frascos con agua, jabón neutro y vileda (interior – exterior) (10).
- Enjuague de frascos desinfectados 10 veces con agua de llave y dos veces con agua destilada (10).

En recipientes plásticos se omite la desinfección con cloro y el secado en la estufa.

1.4.1.2 Cristalería para elaboración de medios de cultivo

- Desinfección de frascos utilizando mezcla sulfocrómica con las debidas precauciones

(guantes para ácidos, mascarillas y gafas protectoras) (10).

- Enjuague de recipientes 10 veces con agua de llave y dos veces con agua destilada (10).
- Secado de frascos resistentes al calor en estufa (10).

1.4.1.3 Otros materiales

Pinzas, bisturí, fiolas, frascos de 500 ml., platillos de metal, placas Petry de cristal, etc., son autoclavados a 121⁰C y 1at de presión durante 30 min (10).

1.4.2 Limpieza y desinfección de la Cámara de Flujo Laminar Horizontal

- Realizar limpieza semanal con cloro en piso y paredes del área de trabajo; desinfectar el interior de la cámara de flujo laminar con alcohol industrial y

colocando cada fin de semana bombas de permanganato (10).

1.4.3 Preparación de agua estéril destilada.

Pomos estériles con agua destilada, tapados con papel aluminio y papel kraft autoclavados a 121°C y 1at de presión durante 25min (10).

1.4.4 Elaboración de Soluciones Madre

Las soluciones madre¹ se elaboran a partir del medio base Murashigue y Skoog, se encuentran agrupadas de acuerdo a las necesidades de nutrientes de las plántulas (macro – micro nutrientes, hormonas, vitaminas, etc.) (TABLA 1)

**TABLA 1
SOLUCIONES MADRE**

Nombre de reactivo	Formulación	Concentración
Nitrato de Amonio	(NH ₄ NO ₃)	1650 mg/l
Nitrato de Potasio	(KNO ₃)	1900 mg/l
Sulfato de Magnesio	(MgSO ₄ · 7H ₂ O)	370 mg/l
Fosfato de Potasio	(KH ₂ PO ₄)	170 mg/l
Acido Bórico	(H ₃ BO ₃)	6.2 mg/l
Sulfato de Manganeso	(MnSO ₄ · 4H ₂ O)	22.3 mg/l
Sulfato de Zinc	(ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	8.6 mg/l
Sulfato de Cobre	(CuSO ₄ · 5H ₂ O)	0.025 mg/l
Cloruro de Cobalto	(CoCl ₂ · 6H ₂ O)	0.025 mg/l
Sodium molybdate	(Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O)	0.25 mg/l

Sulfato Ferroso	(FeSO ₄ · 7H ₂ O)	27.8 mg/l
EDTA	Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.2 mg/l
Cloruro de Calcio	(CaCl ₂ · 2H ₂ O)	440 mg/l
Yoduro de Potasio	(KI)	830 mg/l
Piridoxina - HCl		0.5 mg/l
Tiamina - HCl		1 mg/l
Niacina o Acido Nicotínico		0.5 mg/l
Glicina (recristalizada) (Aminoácido)		2 mg/l
IAA		130 mg/l

Fuente: Centro de investigaciones tecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

1.4.5 Preparación de Medios de Cultivo:

Al preparar medio de cultivo se deben agregar en orden las soluciones madre, y reactivos pesados en agua deionizada. También se pueden elaborar medios de cultivo con agua de coco (10).

¹ KORNEVA, S. B.; MENDOZA, J. Protocolos del laboratorio cultivo de tejidos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador CIBE - ESPOL, 2007

Se toma el pH inicial y se lleva a pH final entre 5.8 - 5.9

(eleva pH: KOH, reduce pH: HCl). Luego se agrega el

phytagel, calentando el medio hasta la ebullición.

Finalmente los medios sólidos y líquidos (sin phytigel ni

ebullición) son autoclavados a 121⁰C y 1at de presión

durante 25 min (10).

CAPÍTULO 2

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), edificio PROTAL de la Escuela Superior Politécnica del Litoral, campus Gustavo Galindo, ubicado en el km 30,5 de la vía Perimetral en la ciudad de Guayaquil, con el apoyo de la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) a través del Proyecto N° PIC – 08 – 0000300.

2.1 Fase 1. Introducción y establecimiento de cultivos de banano y plátano (*Musa spp.*)

Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas de campo en la provincia Los Ríos en el cantón Baba, cada dos semanas durante los primeros seis meses del año 2009, en cantidades entre 25 - 50 cormos de las variedades en

estudio. Para este proyecto de investigación se aplicó muestreo dirigido, debido a que se deseaba obtener las mejores muestras (cormos).

Limpieza de muestras de campo

Se extrajeron las raíces y terrones de tierra de los cormos de banano y plátano recolectados en campo, luego éstos fueron lavados con abundante agua de la pila para su limpieza. Ver apéndice G

Introducción de muestras al laboratorio

Los cormos son reducidos a un tamaño aproximado de 10 cm. realizando cortes longitudinales y transversales. Ver apéndice H

Desinfección de las muestras

Las muestras fueron reducidas a un tamaño aproximado de 5cm., las cuales luego se las sumergió en solución de cloro al 4% durante 20 min. En la cámara de flujo laminar horizontal se traspasaron las muestras a los frascos con agua estéril – autoclavada.

Corte de muestras para siembra en medio de cultivo

A estas muestras se les realizaron cortes longitudinales y transversales reduciendo su tamaño hasta 1cm x 1cm enjuagando las muestras con agua estéril - autoclavada en cada corte. Luego se las colocó en un frasco estéril sin agua para extraer el exceso de ésta sobre el tejido. Se

procedió a sembrarlos uno por cada frasco en medio de cultivo con hormonas.

Mantenimiento de muestras

Los domos meristemáticos sembrados fueron seccionados cada mes hasta obtener un número de plantas adecuado para continuar con los demás experimentos de éste trabajo. Ver apéndice I

Esquema del ensayo

Fueron evaluadas 35 plantas por variedad en estudio en los medios de cultivo ITC – K y BN al tercer y cuarto mes.

Diseño de experimento

En este ensayo se realizaron 2 tratamientos y 35 observaciones por variedad. En total fueron 420 observaciones.

Tratamientos

Todas las variedades de banano y plátano (*Musa spp.*) en este estudio: Orito (AA), Barraganete (AAB), Dominico (AAB), Morado (AAA), Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA) fueron puestas bajo dos tratamientos.

T1: medio de cultivo ITC – K

T2: medio de cultivo BN

Parámetros a evaluar

Índice de multiplicación (IM) por variedad en tratamientos: se evaluaron las variedades al tercer y cuarto mes cuando hubo presencia de plantas completas.

Análisis de datos:

Para el análisis de estos datos se utilizaron tablas y gráfico generados en Excel 2007, además los paquetes estadísticos SPSS 12.0 e Infostat 2.0 (versión estudiantil). Para determinar la diferencia estadística significativa entre variedades ($p \leq 0.05$) se utilizó la prueba de diferencias de proporciones entre variedades y el índice de multiplicación de plantas (N^0 de brotes / N^0 de plantas).

2.2 Fase 2. Obtención de callos

2.2.1 Método de scalps o multimeristemas

Condiciones de plántulas para inicio del método

Los domos meristemáticos (3x3mm) fueron extraídos de las vitroplantas, y puestos bajo oscuridad en el medio de cultivo TDZ durante los dos primeros meses y luego en medio de cultivo P4 (Panis B. 2002). Por otro lado la misma cantidad de domos

meristemáticos fueron puestos bajo oscuridad solo en medio de cultivo P4 durante todo el ensayo. Ver apéndice J

Mantenimiento de subdivisiones de plantas principales

El mantenimiento de las muestras por variedad se realizó cada seis semanas hasta obtener los multimeristemas en proliferación (scalps).

Extracción de multimeristemas

Los multimeristemas (4x4mm) fueron explantados al cuarto mes y sembrados en medio de cultivo H1 (MS), FM1 y ZZ sólido, en presencia de 2,4-D para inducción a callo. Para comprobar la embriogenicidad de los callos obtenidos, estos fueron puestos en medio de cultivo líquido (H1, FM1 y ZZ), a los 7 días se observó bajo microscopio la presencia de células.

Esquema del ensayo

Se utilizaron 50 plántulas de cada variedad, de las cuales la mitad de ellas fueron sembradas en medio de cultivo TDZ y la otra mitad en medio de cultivo P4. Entre el tercer y cuarto mes fueron evaluados los explantes con presencia de scalps, a partir de estos se sembraron todos los scalps en medios de cultivo para inducción

a callo: FM1, ZZ y H1 (sólidos) los cuales se evaluaron al segundo mes de formación de callos. Estos callos pasaron al medio de cultivo FM1, ZZ y H1 (líquido) para su desagregación. Finalmente se observó y fotografió bajo microscopio invertido la presencia de células.

Diseño de experimento

En este ensayo para cada explante: subdivisiones de plantas, scalps y callos se realizaron 6 tratamientos y 25 observaciones por variedad. En total fueron 6 tratamientos y 125 observaciones.

Tratamientos

Para todas las variedades de banano y plátano (*Musa spp.*) en este estudio: Orito (AA), Barraganete (AAB), Morado (AAA), Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA) fueron puestas bajo seis tratamientos.

T1: TDZ, P4, FM1

T2: TDZ, P4, ZZ

T3: TDZ, P4, H1

T4: P4, FM1

T5: P4, ZZ

T6: P4, H1

Parámetros a evaluar

Subdivisiones de plantas: se tomó el número de subdivisiones generadas por las plantas en medio de cultivo TDZ y P4 y porcentaje de fenolización de cada variedad en el experimento. Se las evaluó entre 3 - 4 meses hasta obtener los multimeristemas.

Multimeristemas o scalps: se evaluó a los 3 – 4 meses el número aproximado de scalps por estructura en medio de cultivo TDZ y P4, además del porcentaje de fenolización por cada variedad en el experimento. Se tomaron fotos de éstos explantes bajo estéreo microscopio.

Callos: se extrajeron los scalps de las estructuras y se sembraron en los diferentes medios de cultivo para inducción a callo. En mes y medio a dos meses se evaluó el desarrollo de callos por tratamiento, los que provinieron de medio TDZ y P4 y también el porcentaje de fenolización. Se tomaron fotos bajo estéreo microscopio.

Análisis de datos

Para el análisis de estos datos se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS 12.0 e Infostat 2.0 (versión estudiantil). Para

determinar diferencias estadísticas significativas entre las variedades se aplicó la prueba no paramétrica de Kurskal – Wallis con nivel de significancia al 5% y para la evaluación de los porcentajes de fenolización, subdivisiones de plantas, scalps y callos por variedad tablas en Excel 2007.

2.2.2 Método de meristemos apicales

Extracción de meristemo apical

Los meristemos apicales fueron extraídos de vitroplantas (25 por variedad) obtenidas en laboratorio bajo observación con estéreo microscopio realizando cortes de (1,5 - 2,0mm). Ver apéndice K

Siembra de meristemos apicales

Los meristemos apicales que fueron sembrados en medio de cultivo H1 solido y liquido ($1\text{mg/L}^{-1}/2,4 - \text{D}$) (E. Díaz, 1986) para obtención de callos. Los medios líquidos fueron puestos en agitación en zaranda orbital rotatoria a 90 rpm, bajo oscuridad y a temperatura entre $22^{\circ}\text{C} - 28^{\circ}\text{C}$. Ver apéndice L

Las estructuras obtenidas de los meristemos apicales fueron resembradas en medio de cultivo H1 líquido en agitación para su

mayor multiplicación. Se comprobó la embriogenicidad de los callos desagregados en medio de cultivo H1 líquido observando bajo microscopio invertido y fotografiando la presencia de células.

Esquema del ensayo

De 50 vitroplantas fueron extraídos los meristemos apicales por cada variedad, la mitad de ellos fueron sembrados en medio de cultivo para inducción a callo H1 (sólido) y la otra mitad en medio de cultivo H1 (líquido). Luego fueron observadas la presencia de células por desagregación de callos bajo estéreo microscopio.

Diseño de experimento

En este ensayo se realizaron 2 tratamientos y 50 observaciones por variedad. En total fueron 2 tratamientos y 300 observaciones.

Tratamientos

Para todas las variedades de banano y plátano (*Musa spp.*) en este estudio: Orito (AA), Barraganete (AAB), Dominico (AAB), Morado (AAA), Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA) fueron puestas bajo dos tratamientos.

T1: H1 sólido

T2: H1 líquido

Parámetros a evaluar

Desarrollo de los callos: entre 1- 5 meses se realizó la evaluación antes de cada mantenimiento de las fiolas con las diferentes variedades; se tomó en cuenta el desarrollo de los tejidos así como la fenolización. Para ambos casos se analizó el porcentaje respectivo.

Análisis de datos

Para el análisis de estos datos se utilizaron los paquetes estadísticos SPSS 12.0 e Infostat 2.0 (versión estudiantil). Para determinar diferencias estadísticas significativas entre las variedades se aplicó la prueba no paramétrica de Kurskal – Wallis con nivel de significancia al 5% y para la evaluación de los porcentajes de fenolización y desarrollo de callos tablas en Excel 2007.

En el apéndice M se puede apreciar el esquema general de los procesos realizados en éste trabajo de investigación.

CAPÍTULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Fase 1. Introducción y establecimiento de cultivos de banano y plátano (*Musa spp.*).

En la TABLA 2 se presenta el resultado del porcentaje de hijuelos de las variedades en estudio en medio de cultivo ITC – K sin hormonas, de las cuales la variedad Morado (AAA) es una de las más productivas, seguida de la variedad Barraganete; la variedad Dominico (AAB) en cuanto a producción de nuevos brotes fue nula (datos no se muestran), seguida de la variedad Orito (AA) con el 17.1%. En todas las variedades analizadas según su índice de multiplicación (IM) sólo la variedad Orito no presenta nuevos brotes, las demás presentan por lo menos un brote.

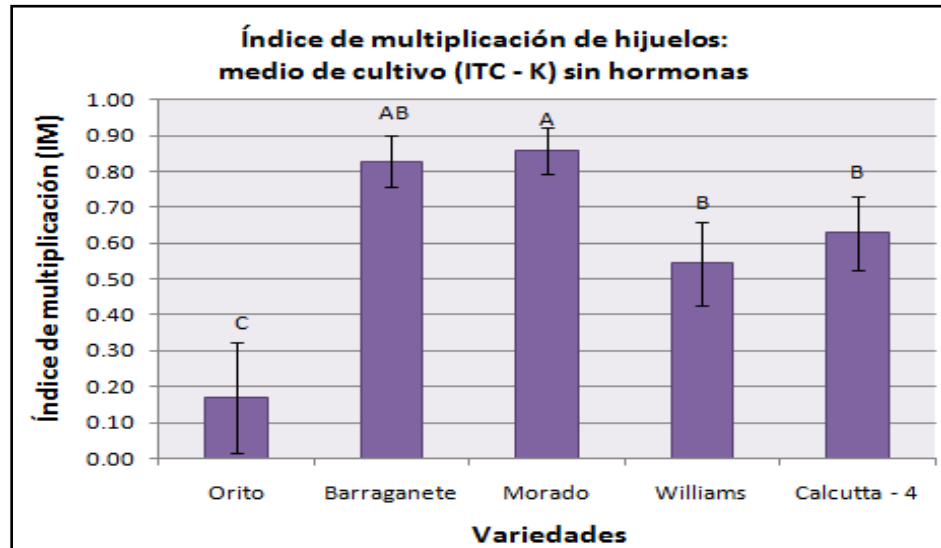
**TABLA
2**

**A
N
Á
L
I
S
I
S
E
S
T
A
D
Í
S
T**

Variedad	No. de plantas evaluadas	No. de hijuelos totales de la muestra	Porcentaje de hijuelos por variedad	IM	Desv Est	Error Estandar
Orito	35	6	17.1	0.17	0.377	0.154
Barraganete	35	29	82.9	0.83	0.377	0.070
Morado	35	30	85.7	0.86	0.350	0.064
Williams	35	19	54.3	0.54	0.498	0.114
Calcutta - 4	35	22	62.9	0.63	0.483	0.103

COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LOS DATOS DE HIJUELOS POR VARIEDAD EN ESTUDIO EN MEDIO DE CULTIVO ITC – K SIN HORMONAS

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.



Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia

FIGURA 3.1 ÍNDICE DE MULTIPLICACIÓN DE HIJUELOS POR VARIEDAD EN ESTUDIO EN MEDIO DE CULTIVO (ITC - K) SIN HORMONAS

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

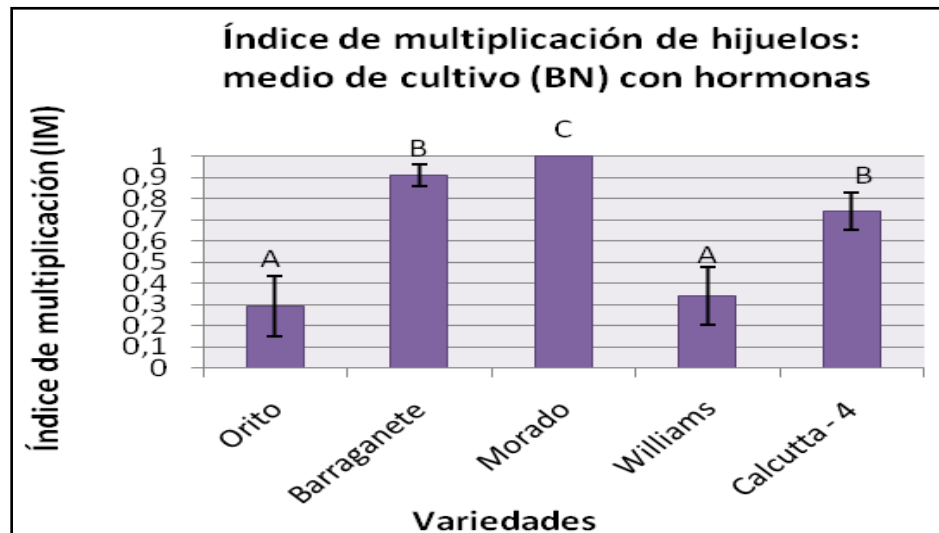
En la FIGURA 3.1 se observa el índice de multiplicación de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo ITC – K sin hormonas. Las variedades Morado (AAA) y Barraganete (AAB) no presentan diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre ellas con un índice de multiplicación de más de 0.80, al igual que las variedades Calcutta – 4 (AA) y Williams (AAA) presentando un índice de multiplicación de más del 0.50. Según los resultados obtenidos, existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre la variedad Orito (AA) con las demás variedades, presentando un índice de multiplicación inferior de 0.17.

En la TABLA 3 se puede observar el porcentaje de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo Bn con hormonas, siendo la variedad Morado (AAA) la de mayor producción de hijuelos o nuevos brotes llegando a presentarse un hijuelo por planta (100%). De todas las variedades analizadas, el desarrollo de hijuelos para Dominico (AAB) fue nula (datos no se muestran), seguida de la variedad Orito (AA). El índice de multiplicación para Barraganete (AAB) y Calcutta – 4 (AA) oscila alrededor de un hijuelo por planta: 0,91 y 0,74 respectivamente.

TABLA 3**ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS DE HIJUELOS POR VARIEDAD EN ESTUDIO
EN MEDIO DE CULTIVO BN (4mg/L⁻¹) CON HORMONAS**

Variedad	No. de plantas evaluadas	No. de hijuelos totales de la muestra	Porcentaje de hijuelos por variedad	IM	Desv Est	Error Estandar
Orito	35	10	28,6	0,29	0,454	0,143
Barraganete	35	32	91,4	0,91	0,286	0,051
Morado	35	35	100	1	0,000	0,000
Williams	35	12	34,3	0,34	0,474	0,137
Calcutta - 4	35	26	74,3	0,74	0,439	0,086

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística



Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia

FIGURA 3.2 ÍNDICE DE MULTIPLICACIÓN DE HIJUELOS POR VARIEDAD EN ESTUDIO EN MEDIO DE CULTIVO (BN) CON HORMONAS

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

En la FIGURA 3.2 se observa el índice de multiplicación de hijuelos por variedad en estudio en medio de cultivo Bn (4mg/L^{-1}) con hormonas. Según los resultados obtenidos, existe diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre la variedad Morado (AAA) con las demás variedades, presentando un índice de multiplicación igual a uno. Las variedades Barraganete (AAB) y Calcutta – 4 (AA) no presentan diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre ellas, al igual que las variedades Orito (AA) y Williams (AAA) siendo éstas últimas las que presentan un índice de multiplicación inferior.

En el apéndice E se muestra el esquema del establecimiento de los cultivo de banano y plátano (*Musa spp.*) hasta la obtención de plántulas de calidad para experimentos subsecuentes.

Discusiones

El plátano y banano son cultivos estériles por su triploidía; son partenocárpicos y sus semillas sexuales son estériles, por consiguiente los mecanismos convencionales de mejoramiento no son aplicables a estas especies, excepto los cruces entre tetraploides y diploides que si son fértiles (24).

Para este ensayo de obtención de hijuelos de banano y plátano se demostró que la variedad Morado (AAA) es mucho más productiva debido a sus características genéticas. Esta variedad produjo un porcentaje de hijuelos del 100% con promedio de un hijuelo por planta en ambos medios de cultivo sin y con hormonas. Según los resultados obtenidos en las investigaciones del CIBE en el laboratorio de Cultivo de Tejidos sobre el promedio de hijuelos para las variedades de los siguientes genotipos tenemos: (AA) 1.81, (AAA) 1.61 y (AAB) 1.55 del promedio de hijos por variedad y debido a que Morado pertenece al genotipo (AAA) figura como una de las variedades mas reproductivas. Para este ensayo en las demás variedades también hubo producción de hijos pero con porcentajes inferiores. Las variedades como los controles Williams (AAA) 34.3% con IM de hijuelos por plantas de 0.34 y Calcutta – 4 74.3% con IM de 0.74 no presentaron similares resultados que en investigaciones anteriores¹ posiblemente por la senescencia celular ya que son cultivos establecidos que han sido multiplicados constantemente para su mantenimiento.

¹KORNEVA S.; MARIBONA R. H.; et al., Cryopreservation of different biological material obtained from plants of genre MUSA spp. (Poster, Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2009).

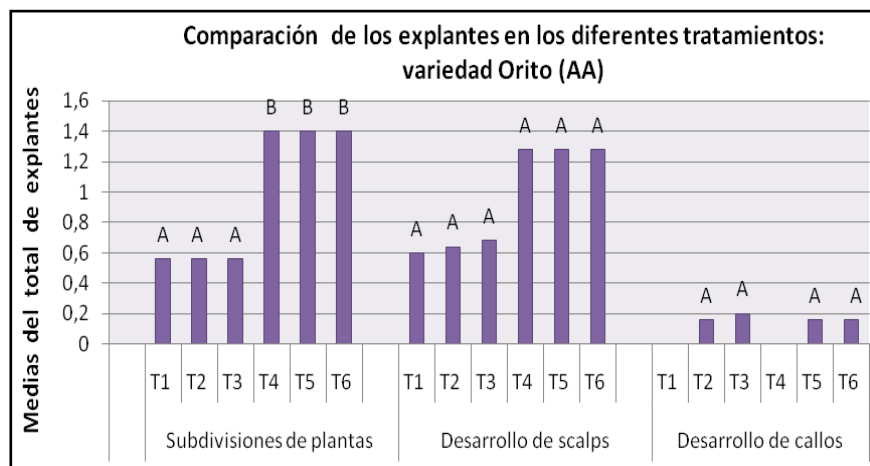
Según estudios de Colmenares el IM para la variedad Williams (AAA) en medio de cultivo con hormonas ($5 \text{ mg} / \text{L}^{-1}$) fue de 2,4; para la variedad Harton (AAB) 4,3 y para la variedad Grand Nain (AAA) en medio de cultivo con hormonas ($2,5 \text{ mg} / \text{L}^{-1}$) fue del 2,1 (27). Demostrando nuevamente al comparar los estudios de Colmenares y CIBE con este proyecto de investigación en medios de cultivo sin y con hormonas, que las variedades triploides particularmente las acumminatas se reproducen mejor en ambientes controlados y bajo diferentes concentraciones hormonales.

3.2 Fase 2. Obtención de callos

3.2.1 Método de “scalps”

Se puede apreciar en la FIGURA 3.3 las medias del desarrollo de los explantes obtenidos hasta el desarrollo de callos.

En las subdivisiones de plantas para la variedad de Orito los tratamientos T4, T5 y T6 fueron óptimos para obtenerlas en mayores cantidades, demostrándose también que existe una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con los tratamientos T1, T2 y T3.



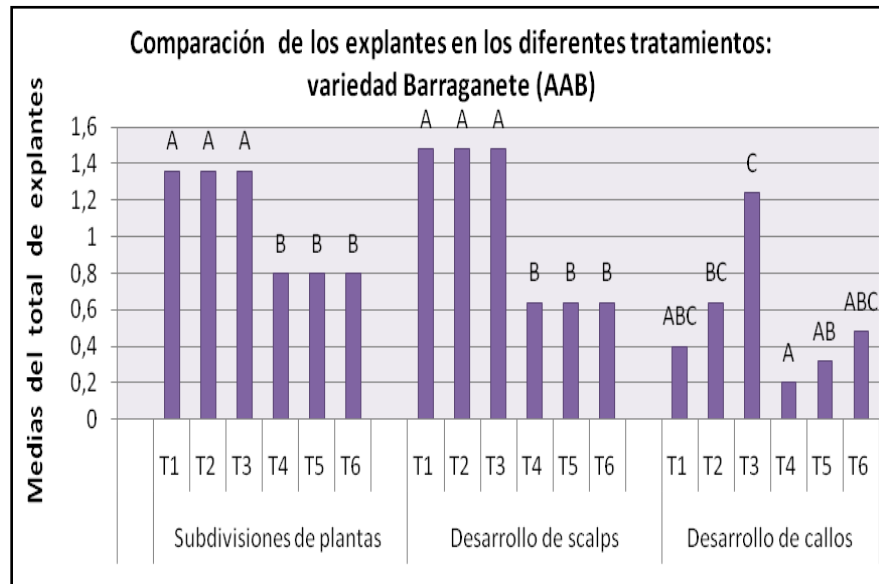
Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia

FIGURA 3.3 MEDIAS DEL DESARROLLO DE EXPLANTES (SUBDIVISIONES DE PLANTAS, SCALPS Y CALLOS) BAJO SEIS TRATAMIENTOS EN LA VARIEDAD ORITO (AA)

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística

Para scalps en esta variedad, los tratamientos T4, T5 y T6 fueron los que indujeron un desarrollo esperado de scalps comparado con los demás tratamientos. Ver apéndice F

En el desarrollo de callos de la variedad Orito los tratamientos T2, T3, T5 y T6 no mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$), siendo los tratamientos T1 y T4 los que no desarrollaron callos en esta variedad y el tratamiento T3 el de mayor desarrollo de éstos.



Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia.

FIGURA 3.4 MEDIAS DEL DESARROLLO DE EXPLANTES (SUBDIVISIONES DE PLANTAS, SCALPS Y CALLOS) BAJO SEIS TRATAMIENTOS EN LA VARIEDAD BARRAGANETE (AAB)

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

Se puede apreciar en la FIGURA 3.4 las medias del desarrollo de los explantes obtenidos hasta el desarrollo de callos.

En las subdivisiones de plantas para la variedad de Barraganete los tratamientos T1, T2 y T3 fueron óptimos para obtenerlas en mayores cantidades, demostrándose también que existe una diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con los tratamientos T4, T5 y T6.

Para scalps en esta variedad, los tratamientos que mostraron mejor desarrollo de éstos fueron T1, T2 y T3 mostrando diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en relación con los tratamientos T4, T5 y T6.

En el desarrollo de callos para la variedad Barraganete los tratamientos T1, T4, T5 y T6 no mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre ellos, siendo los tratamientos T1 y T6 los de mayor desarrollo de callos. De todos los tratamientos para ésta variedad el tratamiento T3 fue el mejor para el desarrollo de callos.

Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia

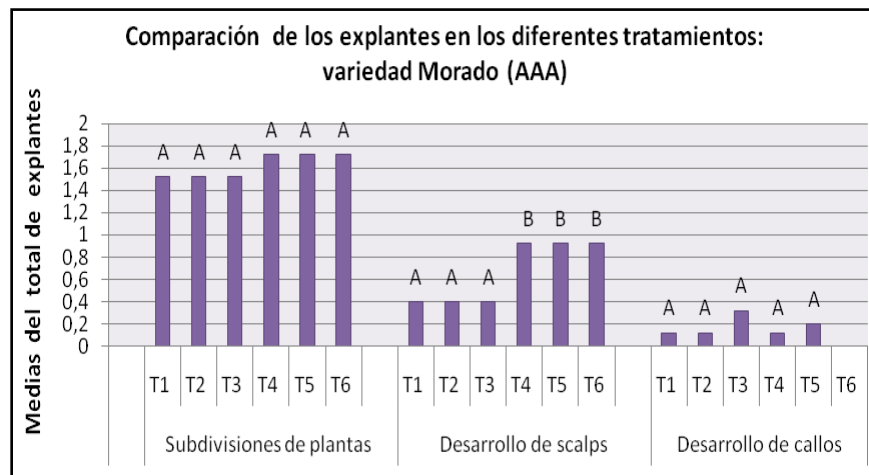


FIGURA 3.5 MEDIAS DEL DESARROLLO DE EXPLANTES (SUBDIVISIONES DE PLANTAS, SCALPS Y CALLOS) BAJO SEIS TRATAMIENTOS EN LA VARIEDAD MORADO (AAA)

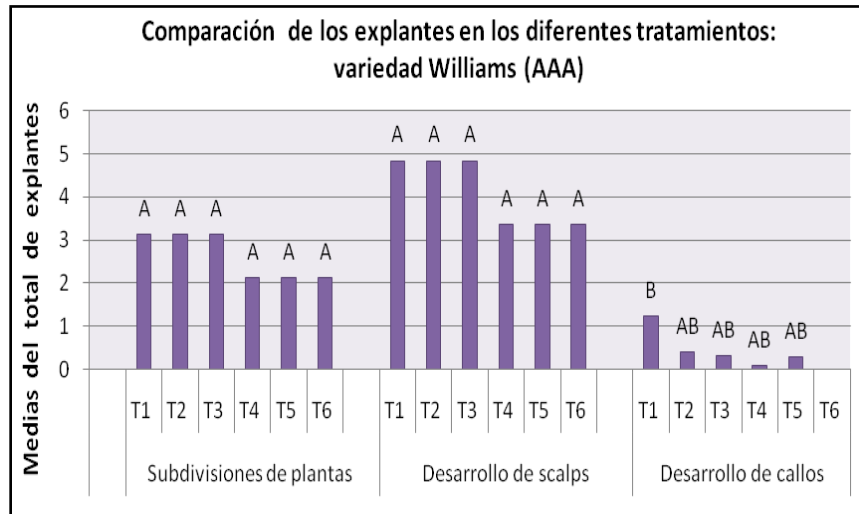
Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

Se puede apreciar en el FIGURA 3.5 las medias del desarrollo de los explantes obtenidos hasta el desarrollo de callos.

En las subdivisiones de plantas para la variedad de Morado no hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos, quiere decir que para esta variedad el desarrollo de subdivisiones de plantas es bueno, en especial para los tratamientos T4, T5 y T6.

Para scalps en esta variedad, los tratamientos T1, T2 y T3 mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en relación con los tratamientos T4, T5 y T6 siendo estos los que mostraron mejor desarrollo de scalps.

En el desarrollo de callos de la variedad Morado los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 no mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre ellos, siendo el tratamiento T3 el de mejores resultados. El tratamiento T6 difiere significativamente ($p \leq 0.05$) con los demás tratamientos debido a que no hay desarrollo de callos en éste.



Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia

FIGURA 3.6 MEDIAS DEL DESARROLLO DE EXPLANTES (SUBDIVISIONES DE PLANTAS, SCALPS Y CALLOS) BAJO SEIS TRATAMIENTOS EN LA VARIEDAD WILLIAMS (AAA)

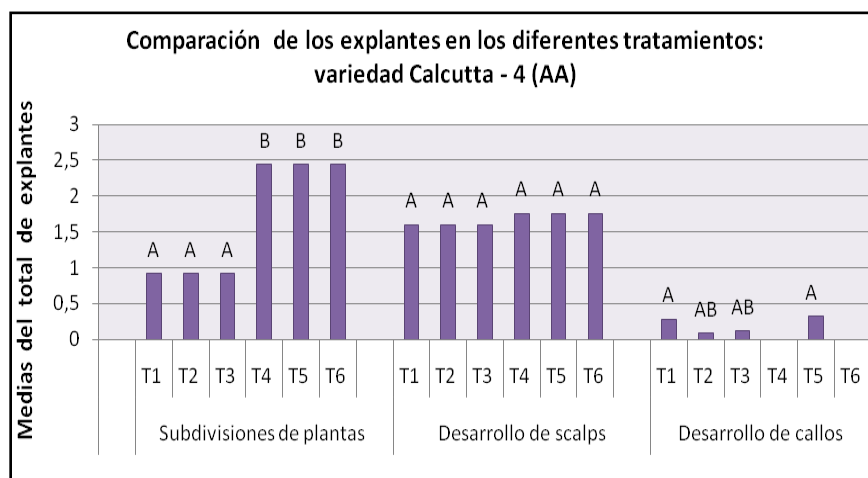
Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

Se puede observar en la FIGURA 3.6 las medias del desarrollo de los explantes obtenidos hasta el desarrollo de callos.

En las subdivisiones de plantas para la variedad de Williams no hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos, quiere decir que para esta variedad el desarrollo de subdivisiones de plantas es adecuado, en especial para los tratamientos T1, T2 y T3.

Para scalps en esta variedad, entre todos los tratamientos no mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$), siendo los tres primero tratamientos T1, T2 y T3 los que presentan mejor desarrollo de scalps.

En el desarrollo de callos de la variedad Williams entre los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 no mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre ellos, siendo el tratamiento T1 el de mayores resultados. El tratamiento T6 difiere significativamente ($p \leq 0.05$) con los demás tratamientos debido a que no hay desarrollo de callos en éste.



Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia

FIGURA 3.7 MEDIAS DEL DESARROLLO DE EXPLANTES (SUBDIVISIONES DE PLANTAS, SCALPS Y CALLOS) BAJO SEIS TRATAMIENTOS EN LA VARIEDAD CALCUTTA – 4 (AAA)

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

Se puede observar en la FIGURA 3.7 las medias del desarrollo de los explantes obtenidos hasta el desarrollo de callos.

En las subdivisiones de plantas para la variedad Calcutta - 4 existe diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos T1, T2, T3 con los demás tratamientos siendo para esta variedad los tratamientos T4, T5 y T6 los de que presentan mejores resultados en el desarrollo de subdivisiones de plantas.

Para scalps en esta variedad, no mostraron diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos, siendo los tratamientos T4, T5 y T6 los de mejores resultados en el desarrollo de scalps.

En el desarrollo de callos de la variedad Calcutta – 4 no hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos T1, T2, T3 y T5, siendo el tratamiento T5 el de mejores resultados en desarrollo de callos.

En la TABLA 4 se muestra el porcentaje de desarrollo de subdivisiones de plantas en medio de cultivo TDZ que fue mejor en las variedades Williams (100%), Barraganete (96%), Calcutta – 4 (81%) y Morado (72%), mientras que para el medio de cultivo P4 todas las variedades mostraron un desarrollo de subdivisiones de plantas superior al 50%.

En la misma TABLA 4 para el desarrollo de scalps, se pueden observar los mejores resultados según los porcentajes en el medio de cultivo TDZ para las variedades Williams (100%), Barraganete (80%) y Calcutta – 4 (65,35%), mientras que en el medio de cultivo P4 las controles mostraron un adecuado desarrollo de scalps con el 80%.

TABLA 4

PORCENTAJE DE EXPLANTES (SUDIVISIONES DE PLANTAS Y SCALPS) DE LAS VARIEDADES DE BANANO Y PLÁTANO (*Musa* spp.) EN ESTUDIO EN MEDIOS DE CULTIVO TDZ Y P4

Explantes (%)	Medios de cultivo	Orito (AA)	Barraganete (AAB)	Morado (AAA)	Williams (AAA)	Calcutta - 4 (AA)
Subdivisiones de plantas	TDZ	44%	96%	72%	100%	81%
	P4	96%	76%	92%	96%	96%
Scalps	TDZ	29%	80%	28%	100%	65,33%
	P4	56%	40%	52%	96%	88%

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

A continuación se detalla en la FIGURA 3.8 los scalps obtenidos por variedad en estudio.

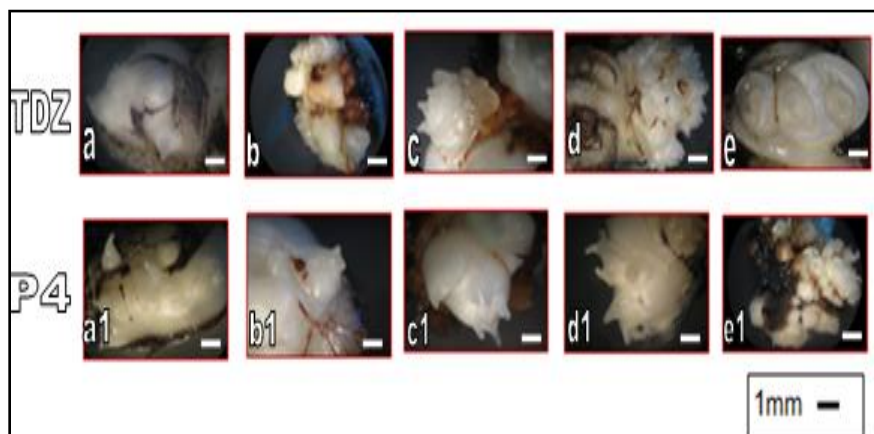
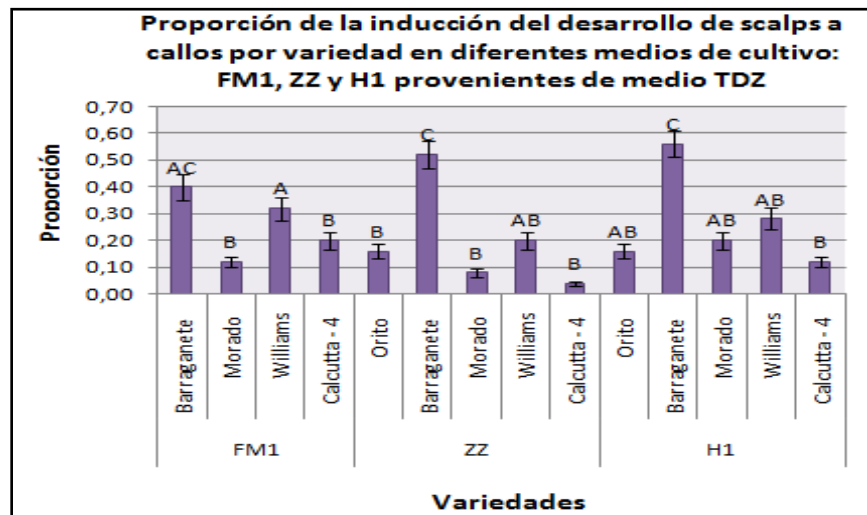


FIGURA 3.8 DESARROLLO DE SCALPS EN DOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN LAS DIFERENTES VARIEDADES DE BANANO Y PLÁTANO (*Musa* spp.) EN ESTUDIO

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

a y a1) Orito (AA); b y b1) Barraganete (AAB); c y c1) Morado (AAA); d y d1) Williams (AAA); e y e1) Calcutta – 4 (AA). La variedad Orito presenta scalps dispersos en grupo de 2 multimeristemas ensanchados, las variedades Morado y Williams visualmente presentan similares desarrollo de scalps en agrupaciones de más de 3 scalps delgados y alargados. Finalmente las variedades de Barragante y Calcutta – 4 presentan scalps envueltos en hojas blancuzcas, que dan la apariencia de rosas vistas desde la parte superior.



Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia

FIGURA 3.9 PROPORCIÓN DE LA INDUCCIÓN DEL DESARROLLO DE SCALPS A CALLOS POR VARIEDAD EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO: FM1, ZZ Y H1 PROVIENIENTES DEL MEDIO TDZ

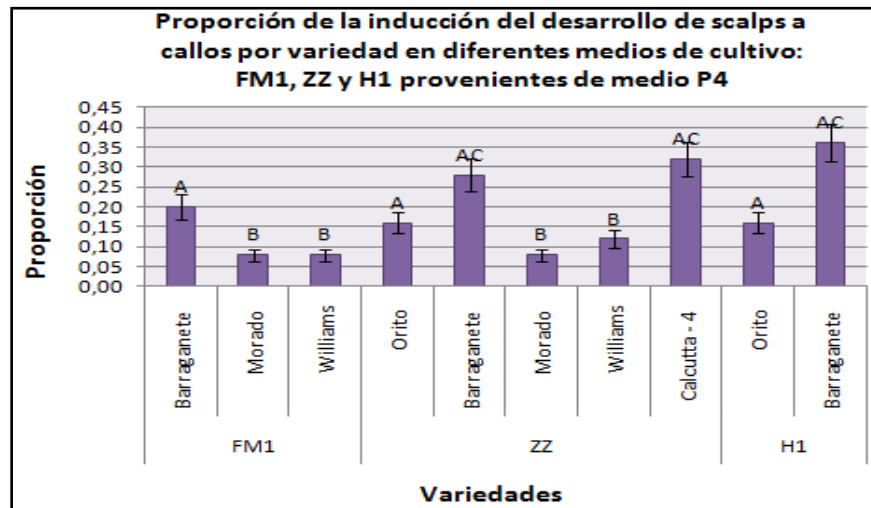
Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

En el FIGURA 3.9 se observa la comparación de las proporciones entre variedades y medios de cultivo para el desarrollo de scalps (provenientes del medio TDZ) a callos.

Para el medio de cultivo FM1 hay mayor desarrollo de callos en la variedad Barraganete (AAB), la cual no posee diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con la variedad Williams (AAA). Ambas variedades poseen diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) en relación con las demás.

La variedad Barraganete en el medio de cultivo ZZ presenta diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) con las demás variedades, siguiéndole la variedad Williams y presentando menor desarrollo de callos la variedad Calcutta – 4 (AA).

En el medio de cultivo H1 los resultados son similares que en el medio de cultivo ZZ, con la excepción de que Calcutta – 4 en medio H1 presenta mayor desarrollo de callos que Calcutta – 4 en medio ZZ.



Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia

FIGURA 3.10 PROPORCIÓN DE LA INDUCCIÓN DEL DESARROLLO DE SCALPS A CALLOS POR VARIEDAD EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO: FM1, ZZ Y H1 PROVIENIENTES DEL MEDIO P4

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

En la FIGURA 3.10 se observa la comparación de las proporciones entre variedades y medios de cultivo para el desarrollo de scalps (provenientes del medio P4) a callos.

El desarrollo de callos en el medio FM1 es mayor para la variedad Barraganete, mostrando diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) con las demás variedades.

La variedad Calcutta – 4 en el medio ZZ presenta mayor desarrollo de callos, seguida de la variedad Barraganete y Orito (AA) entre las cuales no presenta diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) alguna. Las variedades de Morado (AAA) y Williams presentan diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$) en relación con las demás variedades.

La variedad Barraganete en el medio de cultivo H1 presenta un mayor desarrollo de callos, seguida de la variedad Orito, ambas presentan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las demás variedades.

Según los resultados obtenidos en la TABLA 5 se puede observar que el porcentaje de desarrollo de callos en medio de cultivo H1, provenientes de medio TDZ, para Orito (16%), Barragante (56%) y Morado (20%) es el mejor mientras que las variedades control son mejores en medio FM1.

Los callos de las variedades Orito y Barraganete provenientes de medio P4 se desarrollaron mejor en medio de cultivo H1, Morado en los medio FM1 y ZZ, mientras que las variedades control en el medio de cultivo ZZ.

TABLA 5

PORCENTANJE DEL DESARROLLO DE CALLOS POR VARIEDAD A PARTIR DE SCALPS

Explant (%)		Tratamientos	Orito (AA)	Barraganete (AAB)	Morado (AAA)	Williams (AAA)	Calcutta - 4 (AA)
Callos	TDZ	FM1	0	40	12	32	20
		ZZ	16	52	8	20	4
		H1	16	56	20	28	12
	P4	FM1	0	20	8	8	0
		ZZ	16	28	8	12	32
		H1	16	36	0	0	0

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

De la misma manera podemos observar en la FIGURA 3.11 los callos obtenidos a partir de scalps por variedad en estudio.

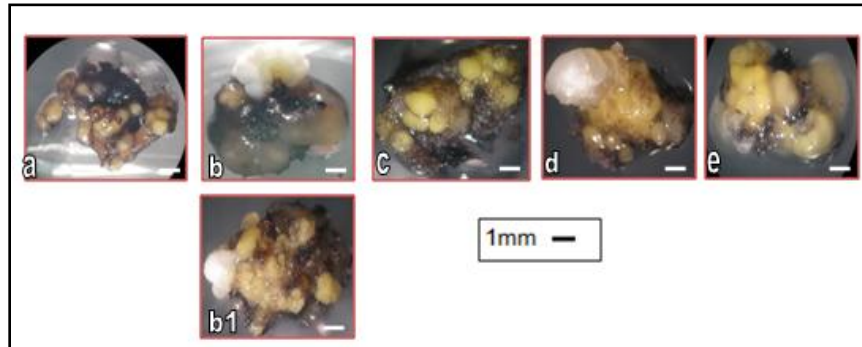


FIGURA 3.11 DESARROLLO DE CALLOS DE LAS DIFERENTES VARIEDADES DE BANANO Y PLÁTANO (*Musa spp.*) EN ESTUDIO

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

a) Orito (AA); b y b1) Barraganete (AAB); c) Morado (AAA); d) Williams (AAA) y e) Calcutta – 4 (AA). Los callos de las variedades Calcutta – 4 y Barraganete presentan coloración amarillo pálido, mostrando barraganete la formación de hojas sobre alguno de los callos; las variedades Williams y Morado presentan coloración amarillo verdoso en callos y por último la variedad Orito presenta coloración beige oscuro en éstos.

En la TABLA 6 se observa que para los tratamientos T4, T5 y T6 el porcentaje de fenolización fue del 100% para las variedades Orito, Barraganete, Morado y Calcutta – 4, mientras que el mismo porcentaje

se obtuvo en los tratamientos T1, T2 y T3 para las variedades Barraganete, Morado, Williams y Calcutta – 4. Se observó también para la variedad Orito en los tratamientos T1, T2 y T3 un porcentaje de fenolización del 98,75% y en la variedad Williams para los tratamientos T4, T5 y T6 el 86,15%.

TABLA 6

PORCENTAJE DE FENOLIZACIÓN DE LOS EXPLANTES (SUBDIVISIONES, SCALPS Y CALLOS) DE LAS VARIEDADES DE BANANO Y PLÁTANO (*Musa* spp.) EN ESTUDIO EN SEIS DIFERENTES TRATAMIENTOS

%	Tratamientos	Orito (AA)	Barraganete (AAB)	Morado (AAA)	Williams (AAA)	Calcutta – 4 (AA)
Fenolización	T1	98,75%	100%	100%	100%	100%
	T2	98,75%	100%	100%	100%	100%
	T3	98,75%	100%	100%	100%	100%
	T4	100%	100%	100%	86,15%	100%
	T5	100%	100%	100%	86,15%	100%
	T6	100%	100%	100%	86,15%	100%

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

Discusiones

Según los resultados de porcentaje de desarrollo de scalps comparados con investigaciones del laboratorio de Cultivo de Tejidos en CIBE, se demostró que las variedades de genotipo AA 68% y AAA 66,2% dan buenos resultados en cuanto a obtención de estos explantes¹.

Para este ensayo se compararon dos medios de cultivo TDZ y P4 en cada una de las variedades observando los mejores resultados en las variedades controles Williams (AAA) en ambos medios de cultivo, seguidos de Barraganete (AAB) 80% en medio TDZ, Orito (AA) 100% y Morado (AAA) 92% en medio P4.

Según investigaciones anteriores el porcentaje de formación de callos a partir de scalps fue entre el 3 – 10% para la variedad Gran Enano (AAA) (9).

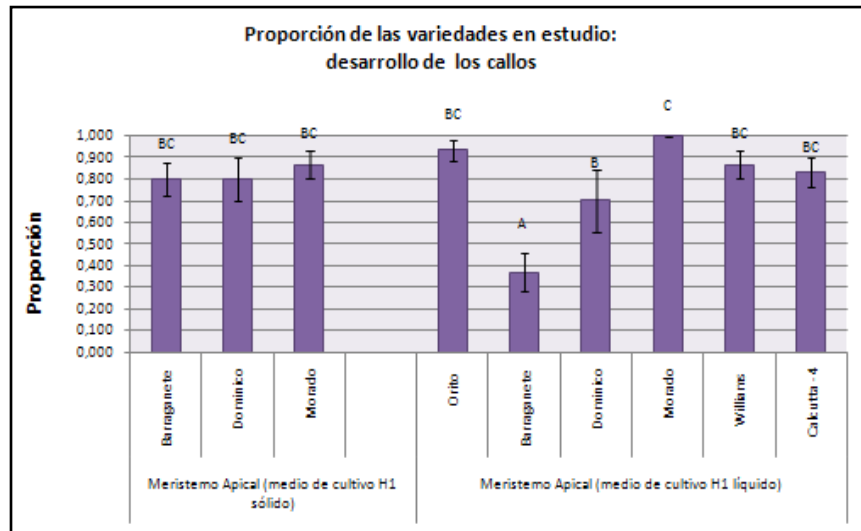
En la TABLA 5 se muestra el porcentaje de desarrollo de callos a partir de scalps de las variedades en estudio de genotipo AAB 56% y AA 16 – 20% provenientes de medio de cultivo TDZ en medio H1,

mientras que para P4 el porcentaje para genotipo AA fue del 8 - 16% y AAB con el 36%. Los callos de los controles para medio TDZ se desarrollaron mejor en medio de cultivo FM1 con el 20 – 32% y en medio de cultivo P4 el mejor desarrollo de callos fue en medio ZZ con el 12 – 32%.

¹KORNEVA S.; MARIBONA R. H.; et al., Cryopreservation of different biological material obtained from plants of genre MUSA spp. (Poster, Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2009).

Se puede determinar que las variedades triploides en estudio dieron mejores resultados debido a sus características genéticas y la influencia de diversos medios de cultivo. Las variedades diplodes en este estudio también generaron buenos resultados, pero no tan relevantes como las variedades triploides.

3.2.2 Método de “meristemo apical”



Letras diferentes indican diferencia estadística al 5% de significancia

FIGURA 3.12 BARRAS DE PROPORCIÓN DE LAS VARIEDADES EN ESTUDIO EN MEDIO H1 (SÓLIDO Y LÍQUIDO)

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

En la FIGURA 3.12 se observa el desarrollo de callos bajo dos tratamientos; en medio de cultivo H1 sólido y medio de cultivo H1 líquido.

En el tratamiento T1 o medio de cultivo H1 sólido el desarrollo de callos en las variedades Barraganete, Dominico y Morado no presentan diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en sus proporciones, quiere decir que estas variedades para este tratamiento responden adecuadamente, en especial la variedad Morado.

Para el tratamiento T2 o medio de cultivo H1 líquido no hay diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre las variedades Orito, Williams y Calcutta – 4, siendo Orito la de mayor desarrollo de callos. De la misma manera la variedad Dominico no presenta diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en relación con las variedades mencionadas anteriormente. La variedad Morado no presenta diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre Orito, Williams y Calcutta – 4, pero es ésta la de mayor desarrollo de callos.

La variedad Barraganete presenta diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en relación con la demás variedades produciendo menor desarrollo de callos en éste tratamiento T2.

En la TABLA 7 se puede observar para el tratamiento T2 que el desarrollo de callos fue del 100% en las variedades Orito y Morado, mientras que para la variedad Barraganete el porcentaje de desarrollo de callo fue del 43.3%.

Para el tratamiento T1 el porcentaje de desarrollo de callos fue mayor del 50% para las variedades Morado, Barraganete, Williams, Calcutta – 4 y Dominico. Mientras que Orito presentó el 23.3%.

TABLA 7

PORCENTAJE DE DESARROLLO DE CALLOS Y FENOLIZACIÓN EN LAS VARIEDADES DE BANANO Y PLATANO (*Musa spp.*) EN ESTUDIO BAJO DOS TRATAMIENTOS

Variedad	Porcentaje de desarrollo de callos	
	Medio H1 sólido	Medio H1 líquido
Orito	23,3	100,0
Barraganete	66,7	43,3
Dominico	80,0	80,0

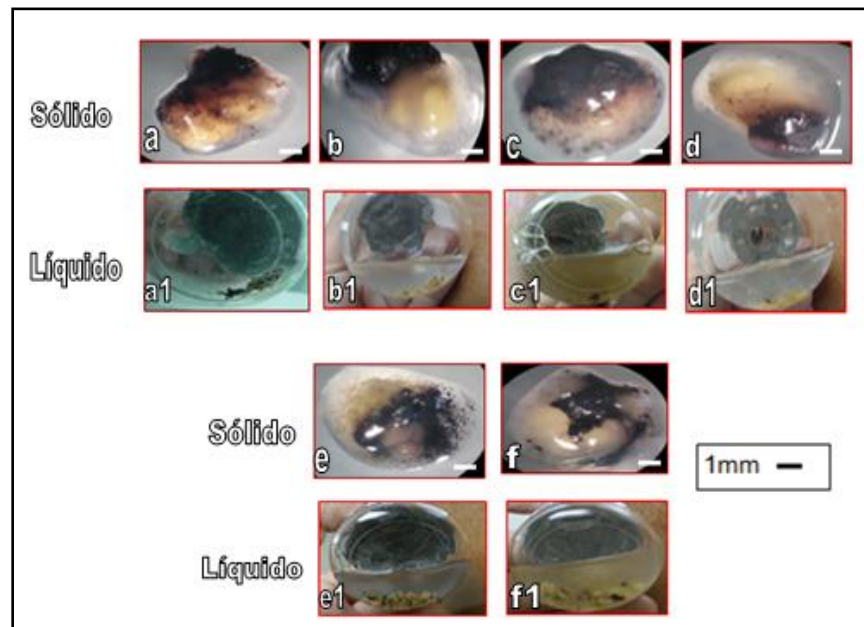
Morado	86,7	100,0
Williams	66,7	80,0
Calcutta - 4	56,7	76,7

	Porcentaje de fenolización	
Variedad	Medio H1 sólido	Medio H1 líquido
Orito	90,0	100,0
Barraganete	56,7	100,0
Dominico	26,7	100,0
Morado	10,0	100,0
Williams	96,7	83,3
Calcutta - 4	93,3	100,0

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Área de Bioestadística.

De la misma manera en dicha tabla podemos encontrar el porcentaje de fenolización del 100% para las variedades Orito, Barraganete, Morado y Calcutta – 4 para el tratamiento T2. Mientras que en el tratamiento T1 encontramos en la variedad Williams un porcentaje de fenolización del 96.7%, y un porcentaje menor en la variedad Morado del 10%.

En la FIGURA 3.13 se observan las imágenes del desarrollo de callos a partir de meristemos apicales en medio de cultivo H1 sólido y



líquido.

FIGURA 3.13 DESARROLLO DE CALLOS DE LAS DIFERENTES VARIEDADES DE BANANO Y PLÁTANO (*Musa spp.*) EN ESTUDIO BAJO DOS TRATAMIENTOS

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

a y a1) Orito (AA); b y b1) Barraganete (AAB); c y c1) Dominico (AAB); d y d1) Morado (AAA); e y e1) Williams (AAA); f y f1) Calcutta – 4 (AA). La variedad Barraganet seguida de la variedad Calcutta – 4 formaron callos y desagregaciones de éstos rápidamente, la coloración que ellos adquieren es de amarillo pálido; las variedades de Dominico y Orito presentan similar coloración de callos (beige oscuro) con la peculiaridad de que Orito se fenoliza rápidamente produciendo la muerte celular. Finalmente las variedades Morado y Williams presentan coloración de callos amarillo verdoso con desagregación lenta.

En la FIGURA 3.14 se observa los distintos tipos de células encontradas luego de la desagregación de los callos de las variedades en estudio.

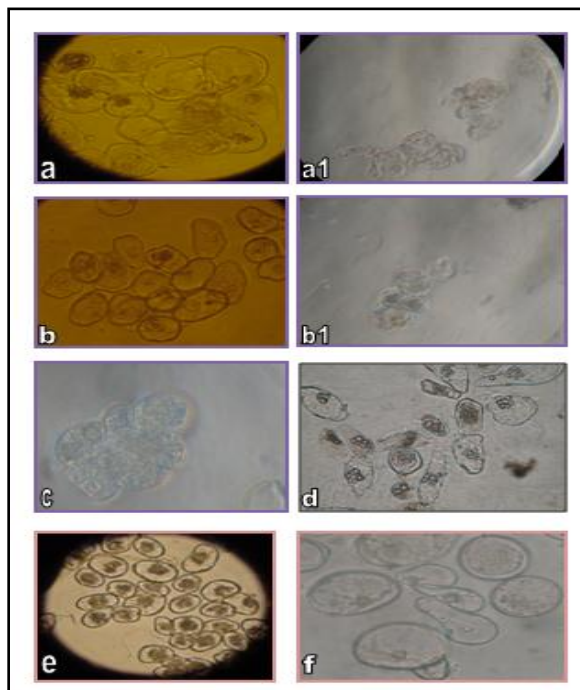


FIGURA 3.14 OBSERVACIÓN DE CÉLULAS DE BANANO Y PLÁTANO (*Musa* spp.) EN ESTUDIO BAJO ESTÉREO MICROSCOPIO

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

a y a1) Orito (AA); b y b1) Morado (AAA); c) Barraganete (AAB); d) Dominico (AAB); e) Williams (AAA) y Calcutta – 4 (AA). La variedad Barraganete al mes y medio presentó células embriogénicas, seguida de las variedades Orito y Calcutta – 4 entre los 3 y 4 meses, las variedades Williams y Morado entre los 7 y 8 meses presentaron células embriogénicas, mientras que Dominico al 9 mes presentó menor número de éstas células. Calcutta – 4 y Williams presentan mayor número de células embriogénicas, las cuales se las identifican por poseer citoplasma completo, estructura redondeada y ser más densas.

Además de observar e identificar el tipo de células, como prueba se plaqueó de las primeras desagregaciones de callos en medio líquido H1 una gota (0.5 ml) sobre medio de cultivo RD1 para regeneración de plantas, de las cuales sólo la variedad de Barraganete (AAB) produjo embrioides, los cuales se aprecian en la FIGURA 3.15

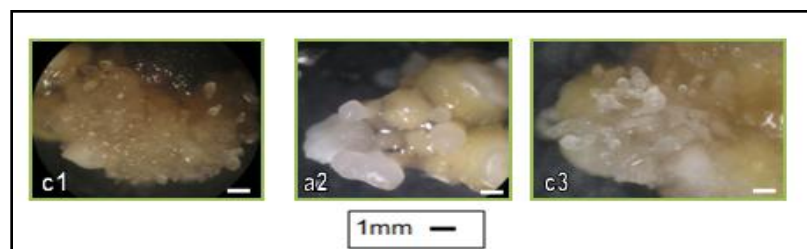


FIGURA 3.15 OBSERVACIÓN DE EMBRIOIDES DE BARRAGANETE (AAB) EN MEDIO DE CULTIVO SIN HORMONAS

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

c1, c2 y c3) Embrioides de Barraganete (AAB). Como resultado del plaqueo de algunas suspensiones generadas sólo se obtuvieron embrioides de Barraganete, los cuales hay que regenerarlos y determinar si son embriogénicos mediante la aparición de parte aérea y radicular de los mismos.

Discusiones

En el desarrollo de callos a partir de meristemas apicales en las investigaciones del laboratorio de Cultivo de Tejidos, se obtuvo en porcentaje de desarrollo de callos en medio de cultivo H1 líquido para las variedades de genotipo de: AA 34,7% y AAA 24%¹.

En este ensayo las variedades Morado AAA y Orito AA en tratamiento T2 dieron el 100%; mientras que para la variedad de Barraganete AAB el 66,7% fue obtenido en el tratamiento T1 en un periodo de tiempo reducido 1 – 2 meses.

Quiere decir que las variedades de genotipo acumminatas responden mejor a la inducción de callos en medio de cultivo H1 líquido en presencia de 1 mg/L^{-1} de 2,4 – D. Se confirma con este método que la obtención de callos es a corto plazo y de mejores resultados, lo que podría contrarrestar las dificultades de establecimiento de futuras suspensiones celulares embriogénicas de banano (11).

¹KORNEVA S.; MARIBONA R. H.; et al., Cryopreservation of different biological material obtained from plants of genre MUSA spp. (Poster, Centro de Investigaciones Biotecnológicas de Ecuador (CIBE), Escuela Superior Politécnica del Litoral, 2009).

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la presente investigación nos permiten concluir lo siguiente:

1. Las variedades Morado (AAA) y Barraganete (AAB) debido a sus características genotípicas poseen capacidad de adaptación y reproducción de brotes en condiciones controladas en laboratorio en medios de cultivo enriquecidos con hormonas.
2. Las variedades Orito (AA) y Morado generan buenos resultados de desarrollo de scalps en medio de cultivo P4, mientras que Barraganete (AAB) lo hace en medio de cultivo TDZ.

3. En ambos métodos de scalps y meristemo apical, la variedad Barraganete mostró mejores resultados de desarrollo de callos, en comparación con las demás variedades. En el método de scalps el mejor medio de cultivo para inducción a callo fue el medio H1, principalmente para las variedades en estudio.
4. Los resultados obtenidos en el método de meristemas apical, permite demostrar nuevamente que el medio de cultivo H1 para inducción a callo es el apropiado para realizar ensayos con este fin y en corto tiempo.

RECOMENDACIONES:

- Es importante a partir de los callos, continuar con el establecimiento de suspensiones celulares embriogénicas y la regeneración de éstas en embrioides, para determinar la variación somaclonal de ambos métodos en laboratorio y campo.
- Establecer un banco de suspensiones celulares embriogénicas de las variedades en estudio, para realizar futuras investigaciones en la mejora genética.

APÉNDICES

APÉNDICE A

VALOR NUTRICIONAL DEL PLÁTANO Y BANANO FRESCO POR 100

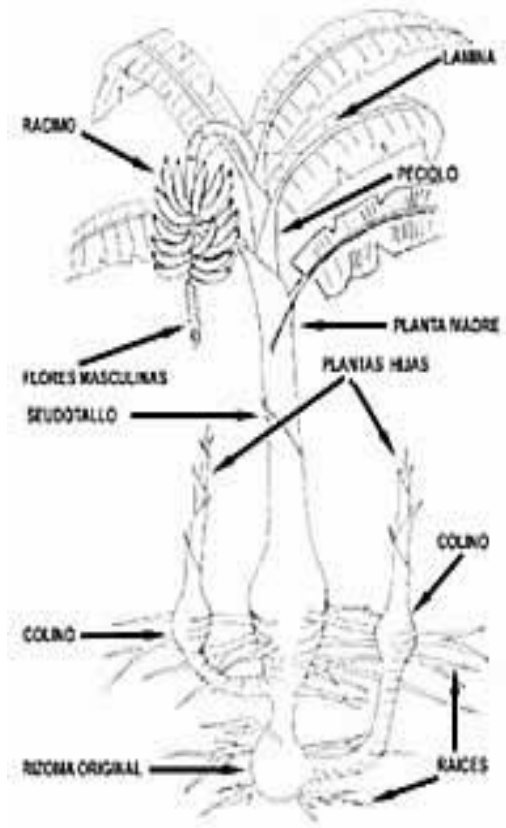
GRAMOS DE SUSTANCIA COMESTIBLE

Agua (g)		75.7
Proteínas (g)		1.1
Lípidos (g)		0.2
Carbohidratos	Total (g)	22.2
	Fibras (g)	0.6
Vitaminas	A (UI)	190
	B1 (mg)	0.05
	B2 (mg)	0.06
	B6 (mg)	0.32
	Ácido nicotínico (mg)	0.6
	Ácido pantoténico (mg)	0.2
	C (mg)	10
Otros componentes orgánicos	Ácido málico (mg)	500
	Ácido cítrico (mg)	150
Sales minerales	Ácido oxálico (mg)	6.4
	Sodio (mg)	1

	Potasio (mg)	420
	Calcio (mg)	8
	Magnesio (mg)	31
	Manganeso (mg)	0.64
	Hierro (mg)	0.7
	Cobre (mg)	0.2
	Fósforo (mg)	28
	Azufre (mg)	12
	Cloro (mg)	125
Calorías (kcal)		85

Fuente: El cultivo del plátano Ing. Agr. M. Sc. Roger A. Landaverde Toruño.
 Consultor del OIRSA (Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria) Publicación 2006 www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/Chef/banana.htm - 26k -

APÉNDICE B
MORFOLOGÍA DEL BANANO Y PLÁTANO



Bananero (*Musa x Paradisiaca*).

Fuente: www.infoagroisp.com/.../plátano_figura1_1.jpg

APÉNDICE C

PLAGAS Y ENFERMEDADES MAS COMUNES DE BANANO Y PLÁTANO

(*Musa spp.*)



PICUDO NEGRO *COSMOPOLITAS SORDIDUS*, GERM.



NEMÁTODOS *RADOPHOLUS SIMILIS*

Fuente: Antecedentes del banana y/o plátano. 2004.

APÉNDICE D

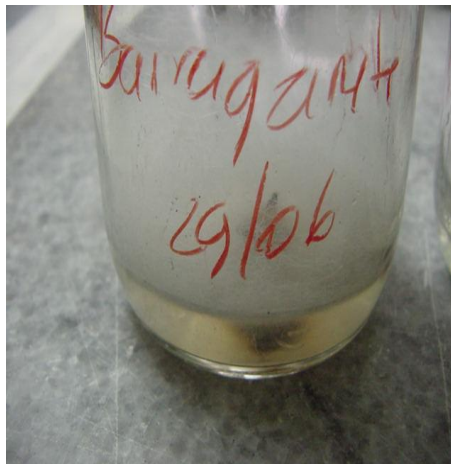
TIPOS DE CONTAMINACIÓN QUE INTERRUMPEN EL BUEN DESARROLLO DE LOS CULTIVOS



Cultivo Fenolizado



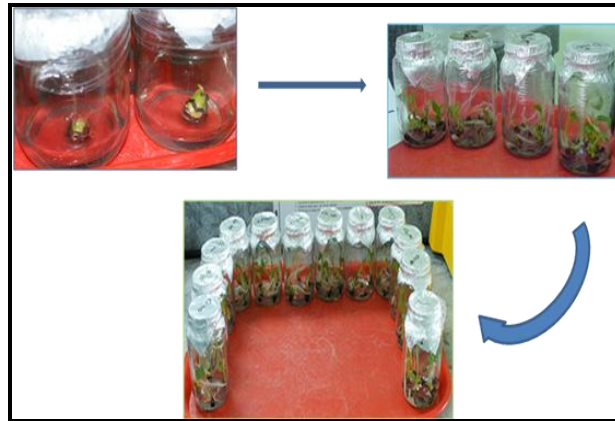
Cultivo No Fenolizado



Cultivo Contaminado

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

APÉNDICE E
RESULTADOS ESQUEMATIZADOS DEL ESTABLECIMIENTO DE
CULTIVOS DE PLANTAS DE BANANO Y PLÁTANO (*Musa spp.*) *IN*
VITRO



Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

APÉNDICE F

TABLAS GENERADAS A PARTIR DE LOS DATOS DEL MÉTODO DE

'SCALPS'

ORITO (AA)

Prueba de Kruskal Wallis							
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H p
estructural	1,00	25	0,56	0,71	0,00	54,68	34,45 <0,0001
estructural	2,00	25	0,56	0,71	0,00	54,68	
estructural	3,00	25	0,56	0,71	0,00	54,68	
estructural	4,00	25	1,40	0,82	1,00	96,32	
estructural	5,00	25	1,40	0,82	1,00	96,32	
estructural	6,00	25	1,40	0,82	1,00	96,32	
Trat. Ranks							
3,00	54,68	A					
2,00	54,68	A					
1,00	54,68	A					
6,00	96,32	B					
5,00	96,32	B					
4,00	96,32	B					
Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)							
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H p
orito1	1,00	25	0,60	1,35	0,00	63,38	7,66 0,0921
orito1	2,00	25	0,64	1,35	0,00	65,78	
orito1	3,00	25	0,68	1,35	0,00	68,18	
orito1	4,00	25	1,28	1,88	1,00	85,22	
orito1	5,00	25	1,28	1,88	1,00	85,22	
orito1	6,00	25	1,28	1,88	1,00	85,22	
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H p
callos1	1,00	25	0,00	0,00	0,00	67,50	2,54 0,1134
callos1	2,00	25	0,16	0,37	0,00	79,42	
callos1	3,00	25	0,20	0,50	0,00	79,74	
callos1	4,00	25	0,00	0,00	0,00	67,50	
callos1	5,00	25	0,16	0,37	0,00	79,42	
callos1	6,00	25	0,16	0,37	0,00	79,42	

BARRAGANETE (AAB)

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
estructura2	1,00	25	1,36	0,70	1,00	90,80	18,60	<0,0001
estructura2	2,00	25	1,36	0,70	1,00	90,80		
estructura2	3,00	25	1,36	0,70	1,00	90,80		
estructura2	4,00	25	0,80	0,50	1,00	60,20		
estructura2	5,00	25	0,80	0,50	1,00	60,20		
estructura2	6,00	25	0,80	0,50	1,00	60,20		
<hr/>								
Trat. Ranks								
4,00	60,20	A						
5,00	60,20	A						
6,00	60,20	A						
1,00	90,80	B						
2,00	90,80	B						
3,00	90,80	B						
<i>Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)</i>								
<hr/>								
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
orito2	1,00	25	1,48	1,12	1,00	93,44	25,58	<0,0001
orito2	2,00	25	1,48	1,12	1,00	93,44		
orito2	3,00	25	1,48	1,12	1,00	93,44		
orito2	4,00	25	0,64	1,11	0,00	57,56		
orito2	5,00	25	0,64	1,11	0,00	57,56		
orito2	6,00	25	0,64	1,11	0,00	57,56		
<hr/>								
Trat. Ranks								
4,00	57,56	A						
5,00	57,56	A						
6,00	57,56	A						
1,00	93,44	B						
2,00	93,44	B						
3,00	93,44	B						
<i>Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)</i>								

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
orito2	1,00	25	1,48	1,12	1,00	93,44	25,58	<0,0001
orito2	2,00	25	1,48	1,12	1,00	93,44		
orito2	3,00	25	1,48	1,12	1,00	93,44		
orito2	4,00	25	0,64	1,11	0,00	57,56		
orito2	5,00	25	0,64	1,11	0,00	57,56		
orito2	6,00	25	0,64	1,11	0,00	57,56		

Trat. Ranks

4,00	57,56	A
5,00	57,56	A
6,00	57,56	A
1,00	93,44	B
2,00	93,44	B
3,00	93,44	B

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
callos2	1,00	25	0,40	0,50	0,00	73,90	9,71	0,0226
callos2	2,00	25	0,64	0,70	1,00	85,30		
callos2	3,00	25	1,24	1,67	1,00	93,38		
callos2	4,00	25	0,20	0,41	0,00	60,20		
callos2	5,00	25	0,32	0,56	0,00	66,74		
callos2	6,00	25	0,48	0,77	0,00	73,48		

Trat. Ranks

4,00	60,20	A
5,00	66,74	A B
6,00	73,48	A B C
1,00	73,90	A B C
2,00	85,30	B C
3,00	93,38	C

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

MORADO (AAA)

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
estructura3	1,00	25	1,52	1,53	1,00	69,98	2,42	0,7442
estructura3	2,00	25	1,52	1,53	1,00	69,98		
estructura3	3,00	25	1,52	1,53	1,00	69,98		
estructura3	4,00	25	1,72	1,34	1,00	81,02		
estructura3	5,00	25	1,72	1,34	1,00	81,02		
estructura3	6,00	25	1,72	1,34	1,00	81,02		

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
orito3	1,00	25	0,40	0,87	0,00	64,40	9,79	0,0265
orito3	2,00	25	0,40	0,87	0,00	64,40		
orito3	3,00	25	0,40	0,87	0,00	64,40		
orito3	4,00	25	0,92	1,04	1,00	86,60		
orito3	5,00	25	0,92	1,04	1,00	86,60		
orito3	6,00	25	0,92	1,04	1,00	86,60		

Trat. Ranks

3,00	64,40	À
2,00	64,40	À
1,00	64,40	À
6,00	86,60	À
5,00	86,60	À
4,00	86,60	À

Letras distintas indican diferencias significativas (p <= 0,05)

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
callos3	1,00	25	0,12	0,33	0,00	77,20	1,58	0,2859
callos3	2,00	25	0,12	0,44	0,00	74,54		
callos3	3,00	25	0,32	0,75	0,00	83,56		
callos3	4,00	25	0,12	0,44	0,00	74,54		
callos3	5,00	25	0,20	0,82	0,00	74,66		
callos3	6,00	25	0,00	0,00	0,00	68,50		

WILLIAMS (AAA)

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
estructura4	1,00	25	3,12	1,90	3,00	86,72	10,00	0,0615
estructura4	2,00	25	3,12	1,90	3,00	86,72		
estructura4	3,00	25	3,12	1,90	3,00	86,72		
estructura4	4,00	25	2,12	1,33	2,00	64,28		
estructura4	5,00	25	2,12	1,33	2,00	64,28		
estructura4	6,00	25	2,12	1,33	2,00	64,28		
<hr/>								
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
orito4	1,00	25	4,84	3,76	4,00	82,28	3,65	0,5883
orito4	2,00	25	4,84	3,76	4,00	82,28		
orito4	3,00	25	4,84	3,76	4,00	82,28		
orito4	4,00	25	3,36	2,36	3,00	68,72		
orito4	5,00	25	3,36	2,36	3,00	68,72		
orito4	6,00	25	3,36	2,36	3,00	68,72		
<hr/>								
Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
callos4	1,00	25	1,24	2,42	0,00	88,48	5,86	0,0160
callos4	2,00	25	0,40	0,96	0,00	78,10		
callos4	3,00	25	0,32	0,56	0,00	82,68		
callos4	4,00	25	0,08	0,28	0,00	68,52		
callos4	5,00	25	0,28	0,89	0,00	72,22		
callos4	6,00	25	0,00	0,00	0,00	63,00		
<hr/>								
Trat. Ranks								
6,00		63,00		A				
4,00		68,52		A B				
5,00		72,22		A B				
2,00		78,10		A B				
3,00		82,68		A B				
1,00		88,48		B				
Letras distintas indican diferencias significativas($p < 0,05$)								

CALCUTTA – 4 (AA)

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
estructura5	1,00	25	0,92	0,76	1,00	59,12	21,32	<0,0001
estructura5	2,00	25	0,92	0,76	1,00	59,12		
estructura5	3,00	25	0,92	0,76	1,00	59,12		
estructura5	4,00	25	2,44	2,40	1,00	91,88		
estructura5	5,00	25	2,44	2,40	1,00	91,88		
estructura5	6,00	25	2,44	2,40	1,00	91,88		

Trat.		Ranks	
3,00	59,12	A	
2,00	59,12	A	
1,00	59,12	A	
6,00	91,88	B	
5,00	91,88	B	
4,00	91,88	B	

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
orito5	1,00	25	1,60	1,47	2,00	72,68	0,63	0,9848
orito5	2,00	25	1,60	1,47	2,00	72,68		
orito5	3,00	25	1,60	1,47	2,00	72,68		
orito5	4,00	25	1,76	1,16	2,00	78,32		
orito5	5,00	25	1,76	1,16	2,00	78,32		
orito5	6,00	25	1,76	1,16	2,00	78,32		

Variable	Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	Promedio rangos	H	p
callos5	1,00	25	0,28	0,46	0,00	86,50	7,07	0,0011
callos5	2,00	25	0,08	0,28	0,00	71,50		
callos5	3,00	25	0,12	0,33	0,00	74,50		
callos5	4,00	25	0,00	0,00	0,00	65,50		
callos5	5,00	25	0,32	0,48	0,00	89,50		
callos5	6,00	25	0,00	0,00	0,00	65,50		

PRUEBA DE KURSKAL – WALLIS

Test Statistics(a,b)	Orito (AA)		
	Estructura1	scals1	callos1
Chi-Square	40,22	9,46	8,89
df	5,00	5,00	5,00
Asymp. Sig.	0,00	0,09	0,11
a	Kruskal Wallis Test		
b	Grouping Variable: Tratamiento		

Barraganete (AAB)			Morado (AAA)		
Estructura2	scals2	callos2	Estructura3	scals3	callos3
27,36	28,46	13,09	2,71	12,69	6,21
5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
0,00	0,00	0,02	0,74	0,03	0,29

Williams (AAA)			Calcutta - 4 (AA)		
Estructura4	scals4	callos4	Estructura5	scals5	callos5
10,53	3,73	13,93	28,12	0,67	20,40
5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
0,06	0,59	0,02	0,00	0,98	0,00

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).

APÉNDICE G

LIMPIEZA DE CORMOS DE CAMPO



Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).
Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

APÉNDICE H

LOS CORMOS PREPARADOS PARA LA INTRODUCCIÓN *IN VITRO*

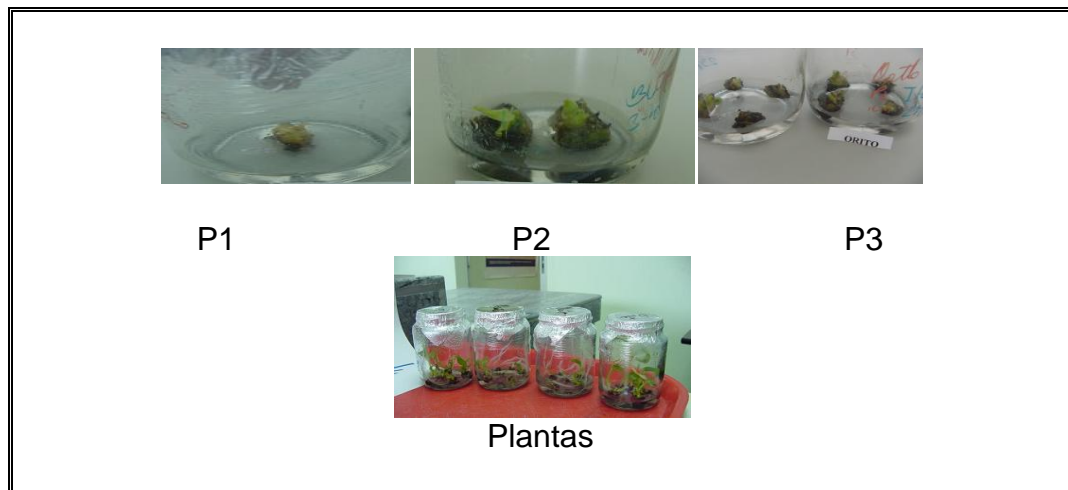


Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).
Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

APÉNDICE I

DISTINTOS ESTADÍOS DE REGENERACIÓN DE PLANTAS DE MUSA SPP.

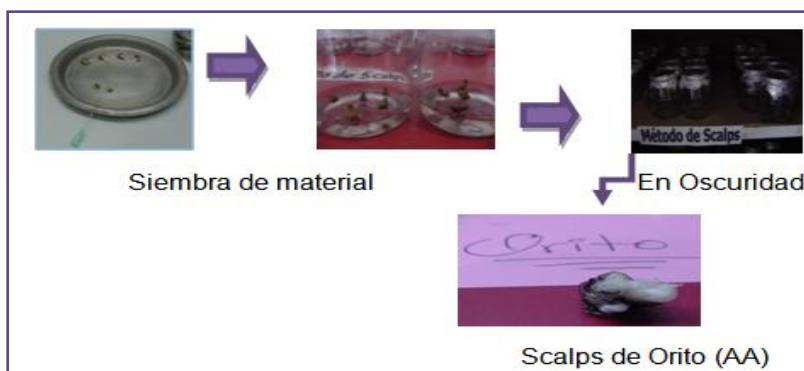
A PARTIR DEL DOMO MERISTEMÁTICO



Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE).
Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

APÉNDICE J

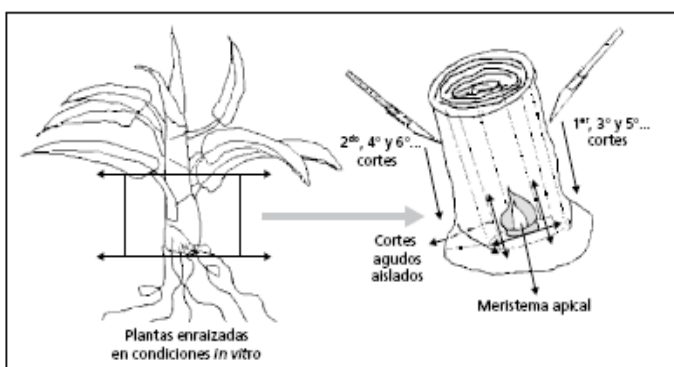
DIFERENTES ESTADÍOS DE OBTENCIÓN DE SCALPS



Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

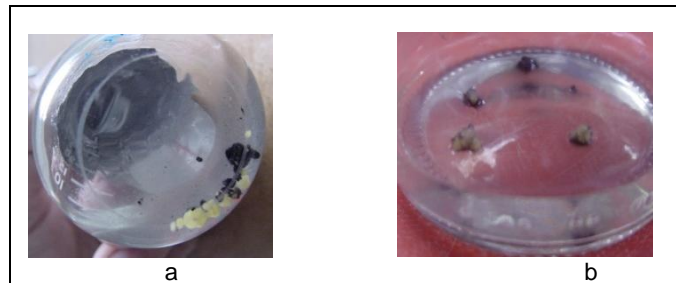
APÉNDICE K

ILUSTRACIÓN DEL AISLAMIENTO DEL MERISTEMA DE BANANO



Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

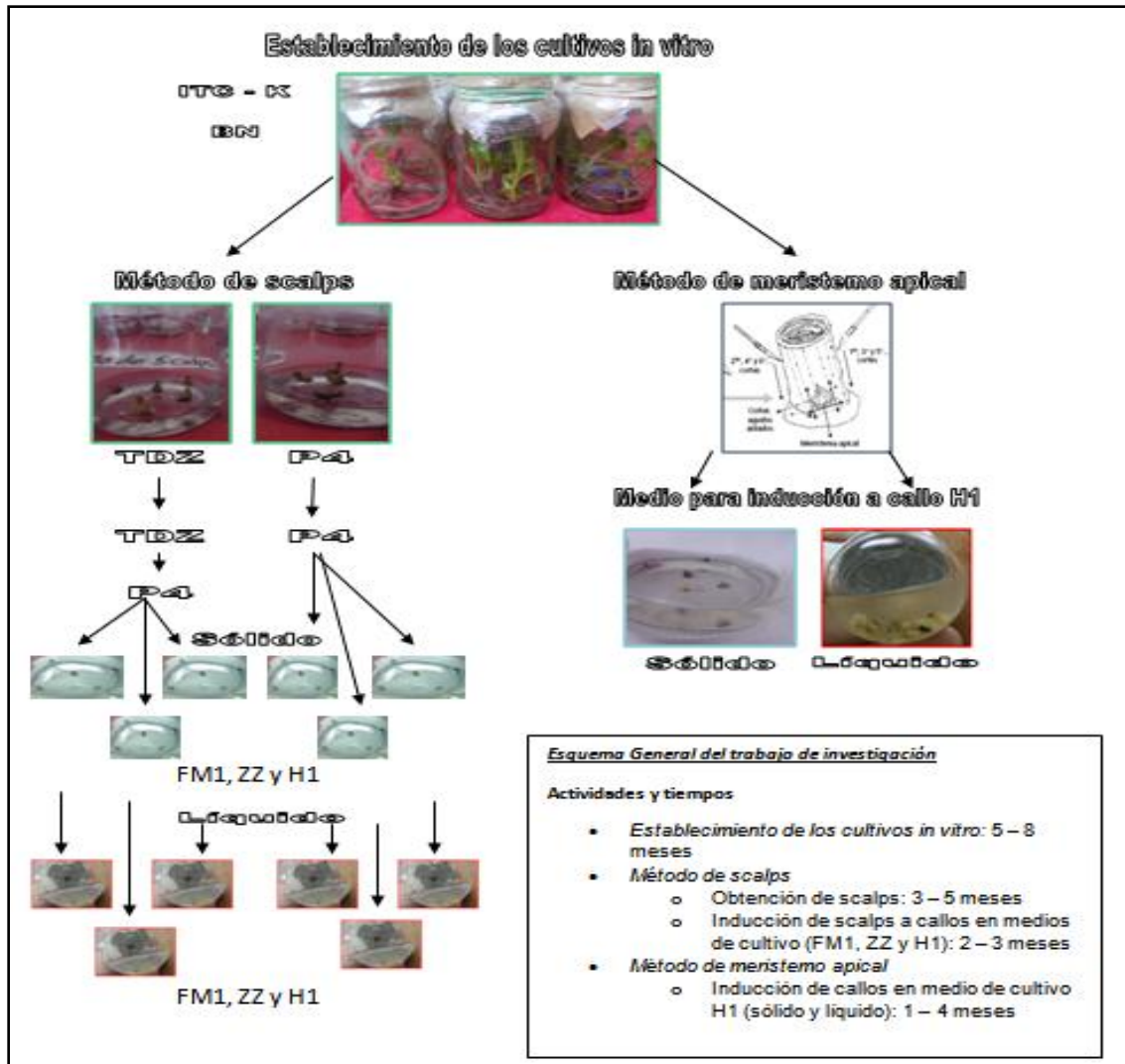
APÉNDICE L
OBTENCIÓN DE CALLOS DE MUSA SPP. A PARTIR DE
MERISTEMO APICAL a) Líquido y b) Sólido



Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

APÉNDICE M

ESQUEMA GENERAL DE PROCESOS REALIZADOS EN TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



- Como prueba adicional de las primeras desagregaciones se plaqueó una gota (0.5 ml) por variedad en medio de cultivo RD1 sin hormonas para la formación de embrioides

Fuente: Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. PETRYK E. NORBERTO, La selección del Chef Plátano /Banana (Artículo disponible en: <http://www.alimentacion-sana.com.ar/informaciones/Chef/banana.htm> 25, 2009)
2. VARGAS R. JOSÉ, Antecedentes de banana y/o plátano (Monografía disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos73/antecedentes-banano-platano/antecedentes-banano-platano2.shtml>, 2004)
3. FAGIANI M. JULIA; TAPIA C. ARNALDO, Cultivo de banano: Estación Experimental de Cultivos Tropicales – INTA Yuto – Jujuy, referente técnico del cultivo del banano (Ficha técnica disponible en: www.inta.gov.ar/yuto/.../tropicales, 2007)
4. MARTÍNEZ G. ALFONSO, Morfología y fisiología de la planta de plátano (CORPOICA) Armenia, Quindío (Presentación disponible en: cadenahortofruticola.org/admin/bibli/106morfologia_fisiologia.pdf, 2006)

5. ANDERSSON L., KUBITZKI K. (ed.), Musaceae. The Families and General of Vascular Plants. Flowering Plants. Monocotyledons. Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae): pp. 296-300 Berlin (Springer-Verlag);1998, Vol. IV (4)
6. EXKART R. KLEBER, Análisis de mercado buenos augurios exportables, Cifras estadísticas Manifiestos y Sopisco News. Bananaexport (Editorial informativa disponible en: <http://bananaexport.com/analisis/index.htm>, 2009)
7. CHEESMAN, E. E., "Classification of the Bananas III". Critical Notes on Species. "Musa paradisiaca L. and Musa sapientum L.": pp. 145–153 Kew Bulletin; 1948, Vol. II (2) n. ° III (3)
8. STOVER, R. H., SIMMONDS, N. W., et. al., Musa x Paradisiaca (Artículo disponible en: [http:// es.wikipedia.org/wiki/Musa_x_paradisiaca](http://es.wikipedia.org/wiki/Musa_x_paradisiaca), 1987)
9. STROSSE, H., DOMERGUE, R., PANIS, B., ESCALANT, J., CÔTE, F., Suspensiones de células embriogénicas de banano y plátano: pp. 5 - 31 Guías Técnicas INIBAP; 2003, Vol. N^o VIII (8)

10. THORPE, T. A., PATE K. R., KORNEVA S. B.; MARIBONA, R.H.; et. al.,
Diplomado en Biotecnología. Cultivo de Tejidos (Presentaciones de curso
en la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL - Peñas): pp. 1 – 8;
1999

11. LERMA S. L., ACUÑA P., et. al., Tasa de multiplicación y potencial de
regeneración de embrioides somáticos de una suspensión celular de
banano (*Musa AAA* cv. “Gran enano”): pp. 38 – 43 INFOMUSA; 2003. Vol.
11, N^o 1

12. MATSUDAIRA K. YEE, Plant Physiology pdf., Cap. 16 Growth and
Development: pp. 324; 1993, © American Society of Plant Biologists.

13. GAUTHERET R., Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*, Cap. III: pp.
108 – 127; 199 – 204; 1999, EDICIONES MUNDI – PRENSA

14. PANIS B., THINH N.T., Crioconservación de germoplasma de Musas: pp.
5 - 39 Guías técnicas INIBAP; 2001, Vol. N^o V (5)

15. SPIEGEL M.R., SCHILLER J., SRINIVASAN R. A., Teoría y problemas de probabilidad y estadística, Estadística, Cap X: pp. 374; 2001, segunda edición, Mc GRAW HILL – INTERAMERICANA SA.
16. JONES I., ROBERT D., Banana, Abaca and Ensete diseases and pests: pp. 7 – 9; (1946 – 1999), ABI Publishing
17. DÍAZ E., et al., Morfogénesis de las Suspensiones Celulares de la Caña de Azúcar. Biotecnología Aplicada Vol. 8: pp. 59 – 60; 1991 La Habana, Cuba CIGB
18. NÚÑEZ A. REMIGIO, El Cultivo del Banano Ministerio de Agricultura y Ganadería (Publicación disponible en: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/.../banano.pdf>, 1989)
19. SICA – ECUADOR, Estudio de mercado del plátano III Censo Agropecuario (Resumen ejecutivo disponible en: http://www.sica.gov.ec/agronegocios/est_pen/DATOS/COMPONENT, 2000)

20. AEBE, Historia del banano, el mapa bananero del Ecuador (Publicación disponible en: <http://www.aebe.com.ec>, 2009)
21. PROEXPORT; Bio-guía para periodistas, Biotecnología Agrícola. (Publicación de Agro-Bio disponible en: <http://www.proexport.com.co>, 2009)
22. CONCI V.C, Biotecnología y Mejoramiento Vegetal, Cap. V (5) Vol. 8: 303 – 313, disponible en: <http://www.inta.gov.ar>, 2004, Ediciones de la Biblioteca INTA Argentina
23. ALVAREZ Ma. A., Cultivo in vitro de vegetales, Biotecnología (disponible en: http://www.ffyb.uba.ar/micro_ind/biotec_alim/clase Biotecnología, 2003)
24. ANGARITA A., PEREA M., Micropropagación de plátano y bananos, Cap. 22 (Revista de la Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/depar/areas/biologia/fisiologia.vegetal.pdf>, 1985)

25. SCHOOF H., Origen de células embriogénicas en *Musa* (Tesis de Doctoral, Universidad Católica de Lovaina, Bélgica, 2009), Infomusa Vol. VI (6), N^o. 1
26. LÓPEZ T. JORGE, MONTANO NERY, et al., Establecimiento de suspensiones celulares en plátanos vianda del grupo (AAB), Comunicación corte Biotecnología Vegetal, Cap. 1: pp. 59 – 62; 2000
27. COLMENARES M., GIMÉNEZ C., Multiplicación *in vitro* mediante sistema de inmersión temporal, Cap. 20: pp. 468 – 477; 2003, Revista de la Facultad Agronomía (LUZ) Venezuela
28. Secretaría del [Convenio sobre diversidad biológica](#), Convenio sobre la Diversidad Biológica, Artículo II (2): pp. 1 – 34; 1992, Río de Janeiro
29. KETCHUM, Elaboración de una planta transgénica: técnica de Biobalística, artículo N^o 28 del cuaderno de Por qué Biotecnología disponible en: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/.../cuaderno>, 2003 – 2004