

Universidad Nacional de San Martín
Facultad de Ciencias Agrarias



**« EFICIENCIA DE 3 MEDIOS DE CULTIVO PARA
MICROPROPAGAR 4 CLONES DE Musa spp.
A PARTIR DE APICES FLORALES »**

T E S I S

Para Optar el Título Profesional de:

INGENIERO AGRÓNOMO

Presentado por el:



Bach. EUCLIDES HIDALGO DIAZ

Tarapoto – Perú
2 0 0 3

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO AGROSILVO PASTORIL
AREA DE BIOLOGÍA


TESIS


“EFICIENCIA DE 3 MEDIOS DE CULTIVO PARA MICROPROPAGAR
4 CLONES DE *Musa* spp. A PARTIR DE ÁPICES FLORALES”

PRESENTADO POR EL:

Bach. EUCLIDES HIDALGO DÍAZ

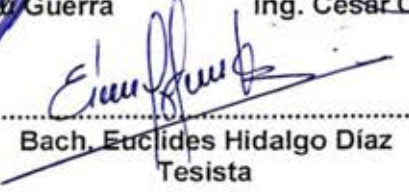
Miembros del Jurado


.....
Blgo. Dr. Jorge Sandoval R.
Presidente


.....
Blgo. M. Sc. Winston F. Rios R.
Miembro


.....
Ing. Luis A. Leveau Guerra
Miembro


.....
Ing. César Chappa Santa María
Asesor


.....
Bach. Euclides Hidalgo Díaz
Tesisista

TARAPOTO, 2003

DEDICATORIAS



A **SABY**:
Con amor y eterna gratitud.
Por haber afrontado con valor
la labor de madre y esposa;
Su inmensa virtud.



Con mucho cariño a mis
hijas: **ANGIE Y SAMANTHA**,
por haberme comprendido,
en los momentos más
difíciles.



A mi querida madre:
TOMASA DÍAZ, por sus
consejos y apoyo
incondicional.

Con mucho afecto a mis
hermanas:
ELVA Y FABIOLA

AGRADECIMIENTOS:

- Al Biólogo **MARCO ANTONIO LEÓN MARTÍNEZ**, por su incalculable apoyo para el desarrollo de la presente investigación.
- Al Ingeniero **CESAR CHAPPA SANTA MARÍA**, por su incondicional apoyo como Asesor de la presente Tesis.
- A los Bachilleres en Agronomía: **HENRY DELGADO HAYA y JIM DICKERSON VASQUEZ**, por su permanente apoyo como compañeros Tesistas en el Laboratorio de cultivo de Tejidos Vegetales.
- A todos mis **Maestros**; a quienes considero, como los pilares fundamentales de mi formación profesional.

CONTENIDO

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	19
V. RESULTADOS	41
VI. DISCUSIÓN	50
VII. CONCLUSIONES	57
VIII. RECOMENDACIONES	58
IX. RESUMEN	59
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
XI. ANEXOS	63

I. INTRODUCCIÓN

Los bananos y plátanos son los productos más consumidos en el mundo. Probablemente originaria de la zona tropical Asiática. Su cultivo se ha extendido prácticamente a todas las regiones del mundo que padecen de heladas ó que sólo la padecen excepcionalmente, **CHAMPION (1968)**.

Los primeros clones de plátano identificados en América fueron **SEDA (*Musa sapientum*)** y el **Francés (*Musa paradisiaca*)**; la expansión de dicho cultivo se intensificó durante las décadas iniciales del siglo XIX, la cual se vio facilitada por la intervención de las poblaciones nativas, las que se encargaron de llevar el material de propagación tierra adentro antes de la llegada de los colonizadores. En esta misma época llegó al Perú como resultado de varias introducciones procedentes del Noreste y Este, **FIGUEROA Y GEORGE (1992)**.

Los bananos y plátanos ocupan el cuarto lugar como alimento en el mundo después del trigo, maíz y arroz; el Perú solo produce para su consumo interno FAO (1995). En San Martín hasta mediados de la última década se cultivó 38 570 has de plátano aproximadamente (datos extraídos del INEI); siendo el principal problema las enfermedades foliares, **FLORES (1986)**.

La propagación común en San Martín, se hace a partir de hijuelos que proceden de plantas madres la misma que no garantiza un estado fitosanitario óptimo y con la finalidad de hacer más eficiente la obtención de material para la

propagación, se planteó evaluar la eficiencia de 3 medios de cultivos para micropropagar 4 clones de *musa spp.* (2 clones de plátano y 2 clones de banano) a partir de ápices florales. Esto implica la introducción, establecimiento in Vitro de los 4 clones de *Musa spp* más consumidos en San Martín, como son: el Inguiri, Bellaco, Seda y Manzano. Las dos primeras precisan de cocción previa y las dos últimas se consumen como fruta fresca.

Las técnicas de micropropagación, permitió obtener clones en laboratorio e invernadero libres de enfermedades, siendo esto uno de los trabajos de micropropagación de interés a nivel regional y del Perú, posiblemente sea también a nivel del mundo.

Se encontró un solo antecedente de investigaciones de micropropagación a partir de ápices florales, que pertenece a **Cronauer y Krikorian 1985**, investigadores del departamento de Bioquímica, división de Ciencias Biológicas de la Universidad del estado de New York.

II. OBJETIVOS

- 2.1. Evaluación de la eficiencia de 3 medios de cultivo para la micropropagación de 4 Clones de ***Musa spp.*** a partir de ápices florales en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la UNSM-T.
- 2.2. Evaluación de las diferentes fases del proceso de micropropagación de los 4 clones de ***Musa spp.***
- 2.3. Obtención de clones de ***Musa spp.*** exentos de patógenos a nivel de laboratorio e invernadero.

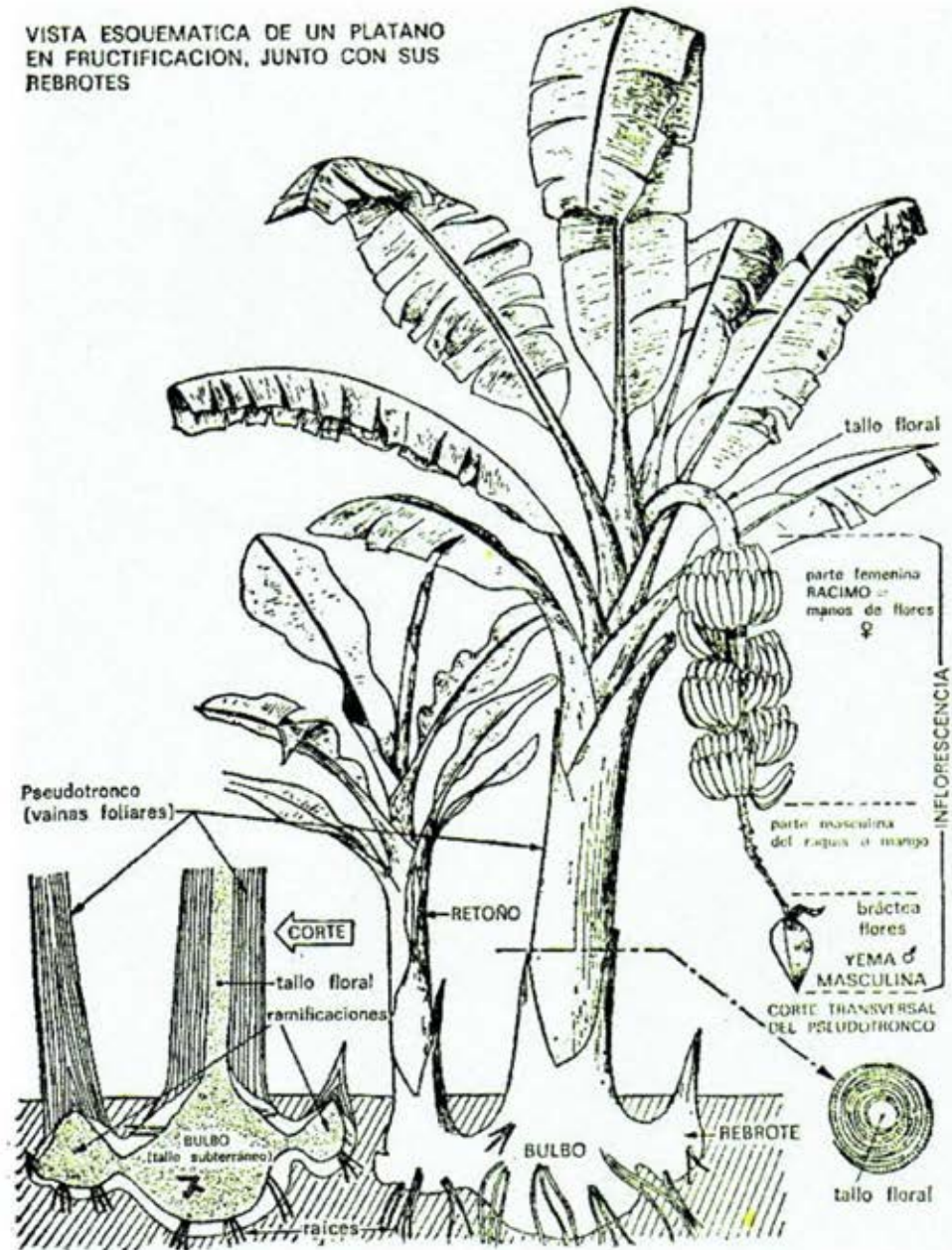
III. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. DISTRIBUCIÓN DEL PLÁTANO EN EL MUNDO

El Plátano, a fines del siglo pasado era una planta casi desconocida en Europa, a donde habían llegado muy escasos ejemplares, traído de las regiones tropicales por naturalistas viajeros, y se conservaban como preciosas rarezas en los invernaderos cálidos de algunos museos de las capitales Europeas. Fue considerado como un fruto exótico debido a la previsión de los tripulantes, quienes para mejorar su alimentación en el curso de las travesías, embarcaban algunos racimos en sus escalas de los Mares del Sur. En nuestros días, tanto en Europa Occidental como en América de la zona templada, es cosa corriente ver racimos de Plátano, las cuales se consumen en cantidades comparables a cualquiera de las frutas conocidas por el propio País importador. El desarrollo de lo que los anglosajones llaman " Industria Bananera ", o sea la producción en zonas tropicales apropiadas con vistas a la exportación a las zonas pobladas y de clima templado, así como la comercialización de esta producción, se ha superado en menos de sesenta años, **Champion (1968)**

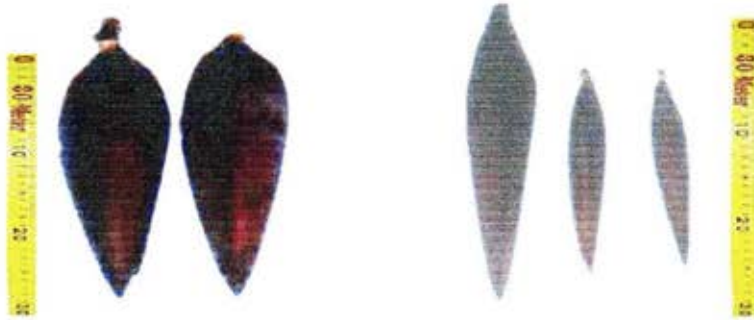
3.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

VISTA ESQUEMATICA DE UN PLATANO EN FRUCTIFICACION, JUNTO CON SUS REBROTES



TOMADO DE CHAMPION (1968).

**3.3. FORMA DEL APICE Y CARACTERIZACION DE LA
YEMA MASCULINA DE CADA CLON.**



INGUIRI – (OVOIDE)

BELLACO – (LANCEOLADA)



SEDA - (LANCEOLADA)

MANZANO - (REDONDEADO)

3.4. TAXONOMÍA DEL PLÁTANO

Las musáceas comestibles Bananos y Plátanos pertenecen a la familia Musáceas, la cual agrupa solo especies diploides en dos Géneros, Ensete y Musa. Se conocen cuatro diferentes números básicos de cromosomas y algunas especies son definidas pobremente, faltando completar su identificación, **MORAN (1986)**.

ORDEN	:	Estamínea
CLASE	:	Monocotiledónea
FAMILIA	:	Musácea
GENERO	:	Musa y Ensete
ESPECIES	:	acuminata, balbisiana, textilis.

Fuente: Figuroa y George 1992

3.5. ALGUNOS CLONES DE PLATANO CULTIVADOS EN EL PAIS

Según Figuroa y George (1992) los clones de Plátano mas importantes en el país son mayormente triploides de *Musa acuminata* (AAA) ó híbridos de *Musa Acuminata X Musa balbisiana* (AABXABB). Dentro de cada uno de estos híbridos existen varios clones derivados de mutaciones que se han perpetuado en diversas localidades.

3.5.1. La seda

Conocida en otros lugares como plátano de guayaquil ó Grossmichel; apareció en cultivo de Burma, Tailandia, Malaya, Indonesia y Sri Lanka. Este clon muestra un seudo tallo de color verde, con manchas oscuras, alcanzando en promedio una altura de 5.0 metros y un diámetro de 25 cm. Las brácteas de la inflorescencia son lanceoladas y se arrollan antes de su desprendimiento del eje del racimo, dejando una base prominente. El Seda muestra mejor

adaptación a las regiones tropicales, especialmente a las áreas húmedas y de suelos fértiles. En la zona del alto Huallaga existen dos clases de este cultivar, que además de variaciones en el vigor de la planta, color del pseudo tallo y características del eje de la inflorescencia presenta diferencias en su tolerancia o susceptibilidad a la Sigatoka.

3.5.2. El manzano

Es un clon cultivado en pequeña escala. La planta se caracteriza por su pseudo tallo de color blanco cremoso, con una altura promedio de 3,90 m y un diámetro en su base de 28 cm. Las flores masculinas son de color amarillo cremoso. El racimo al madurar presenta unos 90 frutos, con un peso por unidad de 110 g. A la madurez fisiológica el fruto es de color amarillo cremoso. En este estado de madurez se agrieta con mucha facilidad. En un corte transversal la pulpa es blanquecina y presenta cuatro filas de óvulos en cada uno de los tres lóculos. Los frutos maduros tienen un sabor ácido dulce agradable con buena aceptación por parte de los consumidores.

Los frutos se desprenden del racimo con mucha facilidad separándose a la altura del pedículo. Este cultivar es altamente resistente a la Sigatoka pero susceptible al mal de Panamá.

3.5.3. El bellaco o hartón

Conocido en otras localidades del trópico como "Hartón" ó "Barraganete", se cultiva en el País tanto en la Selva como en la Costa Norte. La planta muestra un seudo tallo verde Rosado de 3,0 m aproximadamente de altura, y con un diámetro de su base de 24 cm. Las brácteas de la inflorescencia son rectas y caen con facilidad en lo que se diferencia del INGUIRI. Las flores masculinas presentan un color amarillo. El racimo al completar su madurez muestra un promedio de 33 frutos de unos 30 a 40 cm de largo y con un peso por unidad de 650 g. En un corte transversal, el fruto presenta dos filas de óvulos en cada uno de los tres lóculos.

3.5.4. El inguiri

También conocido como "Dominico" en el cual se distinguen por lo menos tres mutantes que difieren en el color del seudo tallo: Así se tiene el Verde Rosado con manchas oscuras. La altura de la planta en promedio es de 3.0 m con un diámetro de 20 cm. Las brácteas de la inflorescencia son rectas, persistiendo las más próximas al badajo. En su composición sobresale el contenido relativamente alto de almidón, consumido mayormente cocido, es resistente al mal de Panamá y a la Sigatoka.

3.5.5. El Cavendish enano

Cultivar llevado desde el sur de la China hacia diversas áreas tropicales y subtropicales del mundo, ha logrado una buena adaptación, especialmente a estas últimas áreas. Este clon presenta el pseudo tallo de color Verde Rosado, con una altura en promedio de 1,80 m y un diámetro de 21 cm, haciéndolo menos susceptible a los daños por el viento por su baja estatura. Las brácteas de la inflorescencia son lanceoladas y rectas. Al alcanzar la madurez comercial el racimo tiene 180 dedos con un peso de 180 g por dedo en promedio. Esta planta es susceptible a la Sigatoka é inmune al mal de Panamá.

3.6. EL CULTIVO "*in vitro*" DE PLÁTANO

Se conoce de un modo general, como cultivos In Vitro al conjunto de métodos y técnicas de laboratorio utilizados en el estudio, propagación, manejo y conservación de Células, Tejidos Segmentos, órganos ó individuos en condiciones artificiales, sea este animal ó vegetal, **MORAN (1986)**.

En nuestro caso el interés principal son las especies vegetales.

A fines del siglo pasado, cuando se realizaron los primeros ensayos del cultivo de células vegetales sobre medios artificiales, se pensó en esta técnica como un medio interesante para el estudio de la "totipotencia celular" y para entender y comprender mejor diversos fenómenos fisiológicos y morfogenéticos, **MORAN (1986)**.

En 1986 luego de que se han desarrollado otras técnicas de cultivo In Vitro, como las de cultivo de órganos, segmentos de órganos, de tejidos aislados, de células, de protoplastos, etc. el conjunto de ellas se ha convertido en un medio útil en diversas ramas de la Agronomía y de la Industria **MORAN (1986), AGRIOS (1995)**. La biotecnología se basa en un conocimiento profundo de la biología molecular (de las plantas), en el uso de varias técnicas de cultivos vegetales y en la capacidad para identificar, aislar, transferir genes específicos de un tipo de organismo (vegetal) a otra planta u otro organismo. Asimismo, la Biotecnología Vegetal permite la rápida clonación de las plantas, acelera y amplía los límites del fitomejoramiento y permite obtener productos vegetales especializados bajo las condiciones de cultivos de tejidos, **AGRIOS (1995)**.

El cultivo de tejidos In Vitro que comprende desde el nivel de organelos, pasando por el nivel celular, hasta llegar al conjunto de nuevos individuos posee en todos los casos ciertas pautas técnicas comunes tales como: El medio de cultivo, los procedimientos de esterilización, la manipulación aséptica, y la extracción de los explantes, técnica de siembra y transferencia en cámaras estériles, la incubación de los explantes, el manejo y conservación de órganos neoformados, el cultivo en medios líquidos, etc. así como la utilización de recipientes de capacidad, tipo y forma diversa, los medios de crecimiento de los explantes, etc. **MORAN (1986)**.

3.7. PRINCIPALES FACTORES DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES “*in Vitro*” .

Según FIGUEROA Y GEORGE (1992)

3.7.1. El medio de cultivo:

La constitución del medio de cultivo esta con relación a los requerimientos nutritivos del explante. Los constituyentes básicos son:

Macronutrientes: N,P,K,Ca,Mg,C, entre otros

Micronutrientes: Fe,I,B,Mo,Mn,Cu y otros

Ambos tipos de nutrientes son utilizados en forma de sales y la cantidad utilizada es variable. El carbón es provisto por medio de la adición de un azúcar; Sacarosa, Glucosa, etc. Este componente es indispensable debido a la incapacidad de los explantes de realizar un proceso fotosintético.

Las Vitaminas tales como el ácido nicotínico, la piridoxina, la aneurina (Tiamina), ú otras y algunos aminoácidos, por ejemplo la cisteína y la glicina son agregados como reguladores del proceso metabólico.

Las hormonas, o reguladores de crecimiento son agregados en tipo y proporción sujetos al crecimiento o desarrollo o ambas que se desea obtener. Algunas veces para este fin se agregan sustancias en composición química no definida tales como el hidrosilato de caseína,

leche de coco, el jugo de algunos frutos por ejemplo de Tomate, de Maíz, etc Otro componente obligado, en los medio sólidos es el Agar, cuyo contenido en vitaminas y otros compuestos hace necesaria su purificación o la utilización de marcas de pureza comprobada.

Según los constituyentes, su cantidad varía de algunos gramos por litro (Agar) hasta micromoles en caso de las vitaminas y hormonas. Es necesario para facilitar la preparación de los medios de cultivo, tener soluciones madres concentradas de los diferentes constituyentes. Las soluciones madres de los nutrientes minerales son bastante estables y pueden permanecer inalterables durante muchas semanas, en el caso de las vitaminas y otros nutrientes orgánicos, especialmente las hormonas, es mejor prepararlos semanalmente.

3.7.2. Procedimientos de esterilización

Para los medios de cultivo el procedimiento de esterilización es físico:

En autoclave entre 115° a 121° C durante 15 a 20 minutos es generalmente adecuado. Sin embargo, en algunos casos es necesario esterilizar por filtración cuando intervienen compuestos termolábiles, ejemplo: las hormonas, las vitaminas, etc. Esta situación se presenta al esterilizar cantidades grandes de medio.

La esterilización de material de vidrio puede hacerse en autoclave, al igual que el material metálico (Pinzas, bisturí, etc.) el cual

es envuelto en papel aluminio aunque también puede realizarse con alcohol etílico y pasaje al calor de la llama de un mechero , o por calor seco (Estufa).

El material vegetal luego de su lavaje en agua corriente y su segmentación, debe sufrir una pre-esterilización con alcohol de 70 % y posteriormente ser esterilizado en hipoclorito de calcio o en hipoclorito de sodio algunos minutos. Si se agrega saponina, dentro del baño del esterilizante no es necesario pre-esterilizar. Luego hay que enjuagar los segmentos en agua destilada estéril.

3.7.3. La siembra y transferencia de los segmentos

Deben realizarse en cámaras especiales portátiles, en cuartos especiales de siembra ó en gabinetes de flujo laminar. En este último caso se trata de equipos con máquinas regulables para la impulsión de aire, el cual es filtrado a través de un filtro bactericida. Es un equipo costoso fabricado para utilización mono ó bipersonal.

Los locales donde se encuentran ubicados los implementos de siembra y transferencia deben poseer lámparas de luz ultravioletas para esterilizar el ambiente antes de iniciar las labores.

3.7.4. La incubación de los cultivos

Se realiza en ambientes donde se puede controlar la duración e intensidad de la luz, la temperatura, la humedad, el volumen y la limpieza del aire, y debe poseer también lámparas germicidas tipo ultravioleta para esterilizar el ambiente.

Igualmente los recipientes utilizados deben contener del 10 al 20 % de su volumen con el medio de cultivo, sea este sólido ó líquido para permitir una buena aireación y espacio para el desarrollo del explante.

En lo posible debe tratarse de poseer ambientes separados para cultivo en medio líquido, debido a su fácil contaminación.

3.7.5. Evaluación del crecimiento

Según se trate de segmentos, de células aisladas o de protoplastos, se sigue los lineamientos clásicos, tales como el peso fresco, peso seco, etc., pero peso seco significa eliminar una parte de los explantes periódicamente. El peso fresco tomando las precauciones correspondientes por el peligro de infección nos da una medida aceptable de crecimiento. En el caso de Células, el contaje es una medida muy corriente y para ello es necesario usar portaobjetos especiales de contaje, que son portaobjetos de cuadrículas grabadas y cubre objetos, para la lectura al microscopio óptico.

3.8. PROPAGACIÓN DE CLONES DE PLÁTANO

El proceso de micropropagación tiene 6 pasos principales:

3.8.1. Selección de material genético de inicio:

Según **Robles (1998)** la caracterización genética del material de partida debe ser rigurosamente garantizada. Para lograr este requisito, se recurre generalmente a los bancos de germoplasma. Si esto no es posible, se puede utilizar material genético bien caracterizado y de huertos mantenidos con buen manejo fitosanitario.

3.8.2. Preparación y desinfección de explante.

En la preparación del ápice **Robles 1998**, recomienda primero proceder a eliminar hojas e hijuelos de cormo hasta obtener una porción de aproximadamente 5 cm que contiene el ápice. En 1985, Cronauer and Krikorian mencionan que para obtener explantes de bellotas es necesario eliminar las brácteas y las inflorescencias masculinas hasta 5 a 8 cm. En esta etapa **Robles 1998**, Cronauer and Krikorian Citado por Vuylsteke (1989) recomiendan hacer la primera desinfección con una solución hipoclorito de sodio entre 0,5 al 1,0 %; para eliminar los patógenos arrastrados por el propio manejo; después el material es llevado a la campana de flujo laminar, donde previo enjuagado con agua destilada estéril se continúa con la eliminación de la vaina de la hoja y tejido de cormo, si trata de bellotas se elimina las brácteas y las inflorescencias hasta dejar en unos 2 cm. Luego se continúa con la segunda desinfección con la solución de hipoclorito de sodio y se vuelve a lavar con agua estéril. Terminado lo anterior, se elimina un poco más

de tejido hasta dejar un explante de 8 mm de longitud, al cual se debe bañar con un antioxidante.

3.8.3. Establecimiento del explante.

Los explantes conteniendo el ápice según Robles (1998), son cultivados en medios de cultivo de iniciación y llevados a los cuartos de incubación donde bajo condiciones controladas de temperatura y luminosidad permanecerán por 30 días. Durante este proceso el explante aumentara de tamaño y adquirirá color verde. Vuylsteke and De Langhe 1985, Sandoval and Muller, 1987 citado por Vuylsteke (1989), afirman que el tamaño del explante es un factor importante en el éxito de cultivo de brotes de plátano y banano, concluyendo que el tamaño apropiado del explantes es de 5 mm de altura.

3.8.4 Multiplicación de brotes o propágulos.

La estimulación de formación múltiple de vástagos o brotes de explantes es activada por el medio de cultivo suplementado relativamente con altos niveles de citokinina. Este medio reduce la dominancia apical del meristemo con el resultado de brotes adventicios axilares, directamente a partir del explante. Lo más inmediato y más efectivo citokinina para el propósito es el BAP (Bencil Amino Purina).Vuylsteke(1989) . Durante este proceso según Robles (1998) se recomienda hacer algunos cortes o fraccionar el ápice con lo que se provoca daño al meristemo apical y con ello se favorece el desarrollo de un mayor número de brotes que se originan de las yemas laterales principalmente, la cual ocurre en aproximadamente 45

días. A partir de este subcultivo, se establecen ciclos de multiplicación de brotes cada 22 días hasta alcanzar el número de propágulos suficientes.

3.8.5. Regeneración de Plantas completas.-

Luego de haber alcanzado la cantidad de brotes suficientes, estos son individualizados y sembrados a un medio de cultivo para enraizamiento, que se caracteriza por no tener citocininas, la cual le permite restablecer la dominancia apical y emitir raíces. En este último subcultivo, la planta estará lista para transferirse a invernadero, en aproximadamente 30 días. **Robles (1998.)**

3.8.6. Aclimatación o endurecimiento de Plantas

Esta es una de las etapas, en ocasiones críticas para el éxito de la micropropagación. Dado que durante su regeneración y crecimiento *in vitro*, dentro de un ambiente aséptico y enriquecido de sustancias nutritivas, baja intensidad de luz y humedad relativa alta, las plantas han desarrollado un pobre aparato fotosintético y escaso control de la transpiración, que las hace muy vulnerables a los factores del ambiente natural. Es por lo tanto indispensable darle a la planta un tratamiento de aclimatación gradual a las nuevas condiciones, lo cual se logra en aproximadamente 60 días bajo condiciones de invernadero – vivero. Durante este tiempo, se generan seis ó más hojas, las cuales resultan ya aptas para funcionar eficientemente en un ambiente natural. **Robles (1998)**

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El presente experimento se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín Tarapoto, situado en la Ciudad Universitaria, cuya ubicación Política y geográfica se describe a continuación.

4.1.1. Ubicación Política.

Distrito	:	Morales
Provincia	:	San Martín
Departamento	:	San Martín
Región	:	San Martín

4.1.2. Ubicación Geográfica.

Longitud Oeste	:	76° 22' 48.4"
Latitud Sur	:	06° 29' 13.2"
Altitud	:	278 m. s. n. m
Clima	:	Bosque seco tropical (Holdridge 1978)

4.2. MATERIALES

MATERIALES DE CAMPO Y LABORATORIO	MATERIALES FOTOGRAFICOS	MATERIALES Y EQUIPOS DE OFICINA
Formato evaluaciones	Película Kodak Color	Papel Bond A4
Phmetro	Cámara Fotográfica	Lapiceros
Hojas y mangos bisturí	Pilas	Lápices
Pinzas		Papel Carbón
Algodón		Computadora
Tijeras		Disquetes
Estéreomicroscopio		Tinta para impresora
Alcohol 95%		
Material de Vidrio		
Pipetas graduadas		
Plumón Marcador		
Medios de Cultivo		

4.3. METODOLOGÍA.

4.3.1. Proceso de la micropropagación.

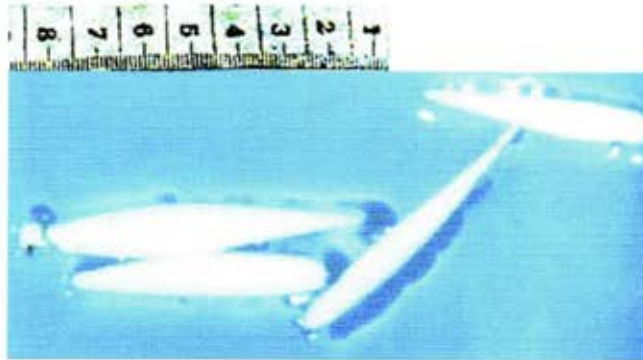
A. Selección y transporte del material de inicio:

El ensayo preliminar de la caracterización del material genético de partida fué del banco de germoplasma de la Estación Experimental de Investigación Agraria "El Provenir", ubicado en el distrito Juan Guerra a 14 de Tarapoto, capital de la Provincia de San Martín, perteneciente al Instituto Nacional de Investigación Agraria, material rigurosamente garantizado. Este material sirvió de base para la colección de bellotas de los alrededores de la Provincia de San Martín: los clones de *Musa sp.* manzano, Seda é Inguiri procedieron del Centro Poblado de San Miguel de Río Mayo y el clon Bellaco del Centro Poblado Menor Las Palmas, comprensión de los distritos de Shanao y Banda de Shilcayo.

Se eligieron bellotas de los clones de *Musa sp.* (Bellaco, Inguiri, Manzano y Seda), los cuales fueron embalados en bolsas de papel, con su respectiva etiqueta de identificación, luego fueron colocadas en bolsas de polietileno. Este material se transportó al Laboratorio de Tejidos Vegetales de la UNSM.

B. Preparación y desinfección del explante.

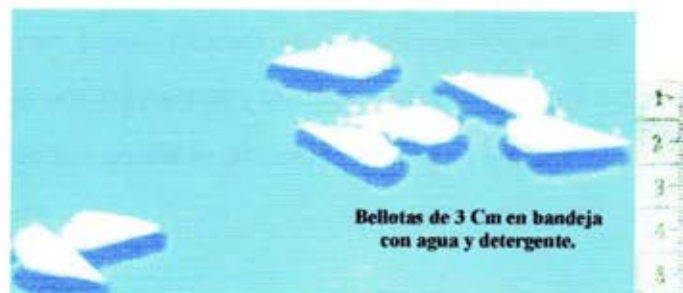
En la preparación de la bellota, primero se procedió a sumergir en una solución de agua con detergente, luego eliminó las hojas superiores o brácteas y flores, hasta obtener una bellota de aproximadamente 8 cm. Este mismo proceso se repitió hasta concluir con la última bellota. Todo este proceso se realizó ex vitro.



Bellotas de 8 Cm en una bandeja con agua y detergente

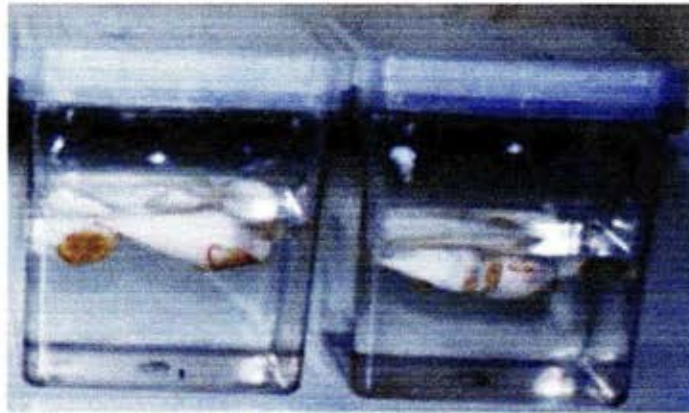
La desinfección se ha realizado siguiendo el mismo proceso propuesto por Cronauer and Krikorian 1985 a.

- **Lavado.-** Las bellotas limpiadas fueron transportadas a una bandeja con agua y detergente, donde se continuó eliminando las brácteas que envolvían al domo apical, hasta obtener una bellota de 3 cm aproximadamente.



Bellotas de 3 Cm en bandeja con agua y detergente.

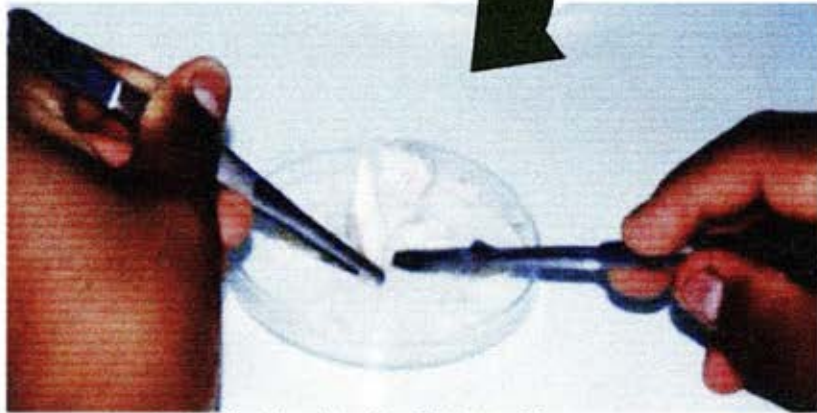
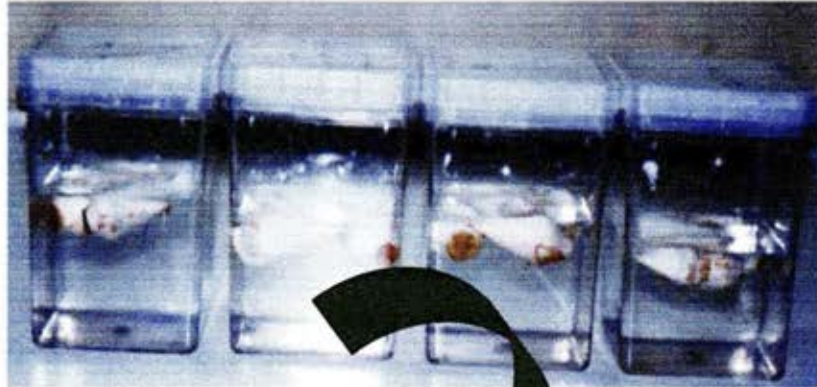
- **Esterilización en hipoclorito.**- Una vez obtenida la bellota de 3 cm se sumergió en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5 % más 3 g de detergente, contenidas en una magenta, preparada para cada clon por un periodo de 5 minutos, eliminando los patógenos arrastrados por el propio proceso.



Magentas conteniendo Bellotas de 3 Cm en Solución de Hipoclorito y Detergente

- **Trabajo en cámara de flujo laminar.**- Una vez que colocamos cada clon en una magenta respectiva con solución de hipoclorito de sodio más detergente. La bellota fue extraída de la magenta con una pinza y depositada en una placa de Petri estéril. Después de este proceso, con la ayuda de un estereo microscopio y un bisturí en el ambiente de la cámara de flujo laminar se procedió a obtener una bellota de 0,5 a 0,8 cm.

Magentas conteniendo Bellotas en hipoclorito



Seccionamiento de la Bellota hasta 0,5 cm

- **Enjuague con agua destilada.**- Las bellotas de 0,5 a 0,8 cm fueron transportadas con la ayuda de una pinza desde la placa de Petri hasta un vaso de precipitación, que contenía agua destilada estéril, donde se enjuagó por un periodo de 30 segundos.

- **Obtención del explante.**- Luego del proceso anterior se procedió a colocar las bellotas en otra placa de Petri, en el mismo estéreo microscopio y en lugar de bisturí se utilizó agujas estériles de jeringas hipodérmicas, para eliminar las brácteas y flores finales de la bellota hasta dejar expuesta el domo apical, con las misma agujas, previamente flameadas en llama de mechero de alcohol se realizó la incisión de 2 mm en el domo apical, obteniendo un explante listo para la siembra en los medios de cultivo.



Obtención del explante de 2mm de longitud aproximadamente.

C. Establecimiento del explante.

Los pequeños trozos de tejidos (explantes) conteniendo el domo apical, fueron inoculados en medio de cultivo de iniciación (frasco de vidrio de capacidad 15 oz. Que contenían 50 ml de medio líquido esterilizado) que se explican en el cuadro N° 1, lo cual es una parte de la materia en investigación. Los explantes inoculados, se trasladaron a la cámara de incubación a una temperatura de 25 ° C +/- 2 y una humedad relativa del 84 % que duró 15 días.

El repique se realizó después de 15 días de incubado, que consistió en trasladar el explante a un medio de cultivo con la misma formulación y de reciente preparación, con la finalidad de reforzar los metabolitos que requiere el explante para continuar con su diferenciación. El repique fue realizado durante 4 meses y a una misma frecuencia; donde solo se observó una gran cantidad de Embrioides, pero al no obtener Protocormos ni diferenciación a plántulas se procedió a prolongar la frecuencia del repique a 30 días, donde se ha obtenido las primeras plántulas.



D. Multiplicación de brotes.

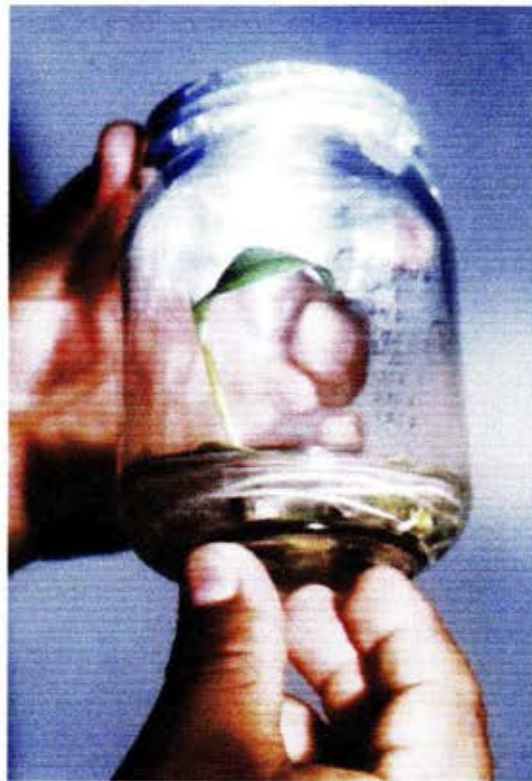
Con los protocormos obtenidos a las 30 semanas, se procedió a cambiar el medio de cultivo basal, por el de multiplicación. El medio basal contenía sales minerales formulado por Murashige and Skoog (M S 5519), con pH 5,83 a una dosis de 1 sobre (1 g) por litro y el medio de multiplicación contenía un sobre de M S 5519, 0.1125 g de BAP (bencil amino purina), 1,0 g de ácido ascórbico, 8,75 mg de AIA (ácido indol acético) a un pH 5,81.

Los protocormos fueron incubados en las mismas condiciones ambientales que el explante, durante 8 semanas, sin obtener los resultados esperados (brotes por explante)



E. Regeneración de plantas completas.

A falta de tener resultado positivo en la etapa de multiplicación de brotes, pero como se ha obtenido diferenciación de plántulas en los explantes en la etapa de mantenimiento, se procedió a regenerar estas plantas individualizándolas y cambiándolas a frascos con medio de cultivo líquido con BAP y Kinetina a diferentes dosis según los tratamientos establecidos en el presente trabajo de investigación, donde se enraizaron.



**Regeneración de Plantas Individuales
obtenidas en la etapa de Mantenimiento**

F. Aclimatación y endurecimiento.

A continuación se describe el proceso:

a. Preparación y Acondicionamiento de plántulas

- **Extracción de las plántulas:**

Las plántulas previamente seleccionadas contenidas en sus respectivos frascos fueron trasladadas de la sala de incubación a un ambiente donde abrimos los frascos, donde se extrajeron las plántulas de regeneración con la ayuda de una pinza y depositamos en una placa de Petri.

- **Limpieza:**

Las plántulas de cada clon fuera del frasco fueron lavadas con agua destilada estéril, dejándola exenta de todo contacto con el medio de cultivo.

- **Recorte de hojas y raíces:**

Con la plántula limpia, procedimos a cortar las raíces, que envolvían al pseudo tallo; posteriormente se cortó las hojas en la siguiente proporción al 100 %, 25 % y 0 %.

- **Siembra en sustrato:**

La siembra de las plántulas fue realizada en un sustrato con las siguientes características, una cantidad de arena, una cantidad de tierra negra, dos cantidades de materia orgánica (humus de lombriz); que luego de mezclarlos, se esterilizó a

una temperatura vapor +/- de 70 a 80 °C en un autoclave semitapado por 45 minutos y se retiraba a enfriar sobre una lona y luego ser envasada en bolsas plásticas, para finalmente realizar la siembra. Al sustrato se adicionó una solución a base de fertilizante foliar (4 % S, 1 % Mg, 0,03 % B, 0,39 % Co, 0,16 % Cu, 2 % Fe, 0,5 % Mn, 0,04 % Mo y 0,6 % Zn) a dosis de 16,5 ml por litro de agua.

- **Acondicionamiento en Cámara Húmeda:**

Una vez que las plántulas fueron sembradas en el sustrato preparado se procedió al acondicionamiento en la cámara Húmeda con temperatura, humedad relativa alta y luminosidad controlada para lograr que las plántulas fortalezcan su pobre aparato fotosintético y su escaso control de transpiración para ser menos vulnerables en el ambiente natural. Adicionalmente a este tratamiento se le ha reforzado una cámara húmeda más pequeña para ensayar el porcentaje de supervivencia de las plántulas con hojas completas y practicando cortes a las hojas en diferentes porcentajes 100%. 25%.



Plantitas en Cámara húmeda, durante la Aclimatación



Acondicionamiento de una Cámara húmeda pequeña para ensayo de Supervivencia de plantitas con hojas completas, con cortes del 25 y 100%.

4.3.2. Evaluaciones Realizadas.

A. Evaluación de la fase del establecimiento del explante

a. Porcentaje de contaminación.

Se evaluó el número total de frascos sembrados a los tres días después de la siembra, la existencia de microorganismos contaminantes, que podían alterar el trabajo de investigación.

b. Porcentaje de supervivencia a las dos semanas.

A las dos semanas se evaluó el número de explantes vivos del total de frascos sembrados por cada tratamiento.

B. Fase de Regeneración

a. Número de embrioides a las 8 semanas.

Hipotéticamente se esperaba un considerable número de protocormos tal como fue planteado en el proyecto de investigación, lo cual no sucedió, dándonos resultado a las 8 semanas una considerable formación de embrioides los cuales fueron evaluados.



Formación de Embrioides a las 8 Semanas

b. Número de plántulas por explante a las 20 semanas.

Conforme a lo programado en el proyecto de investigación no se ha obtenido resultados a las 10 semanas por el proceso de multiplicación. Solo se ha obtenido a las 20 semanas por diferenciación en la etapa de mantenimiento, siendo estos contabilizados.

c. Número de protocormos por explante a las 30 semanas.

Según lo programado se esperaba contar con protocormos a las 6 semanas; esto se hizo realidad a las 30 semanas, los cuales fueron contabilizados.

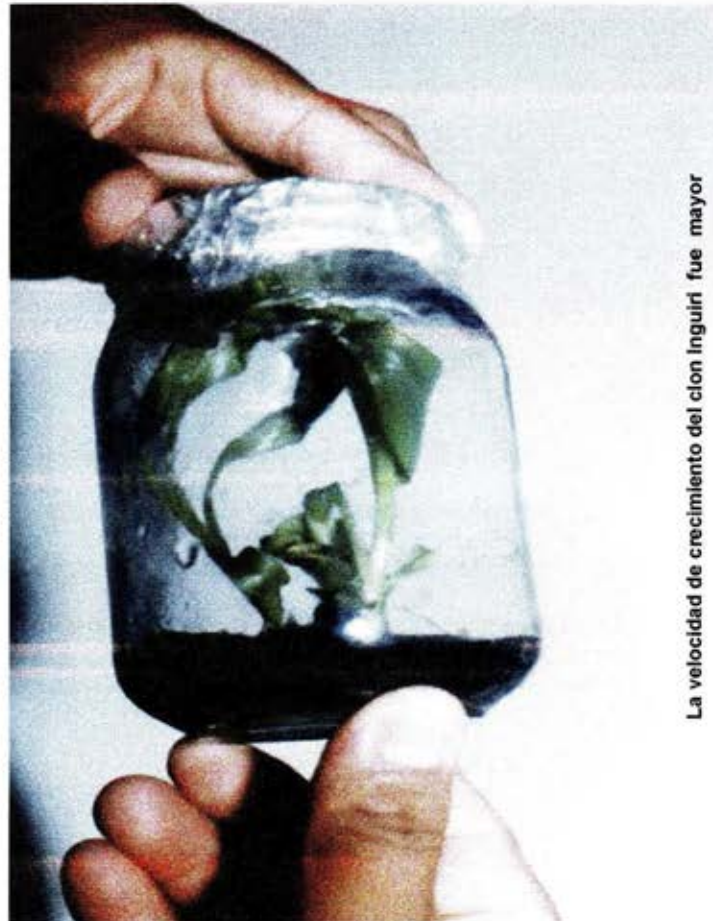


B.1. Regeneración de plantas completas.**a. Número de plantas diferenciadas por cada clon.**

Se contabilizó el número de plantas diferenciadas en la fase de mantenimiento, se sometió al análisis estadístico.

b. Velocidad de crecimiento en el medio líquido.

Se ha medido las plántulas cada 15 días, utilizando una regla graduada de 30 cm, Se ha realizado tres evaluaciones con lo cual se hará una curva comparativa de crecimiento.



La velocidad de crecimiento del clon Inguiri fue mayor

B.2. Regeneración de plantas completas.

a. Número de plantas diferenciadas por cada clon.

El número de plantas obtenidas por explantes fue contado por observación directa en cada frasco

Conteo de Clones Manzano y Seda



b. Velocidad de crecimiento en el medio líquido.

Las plántulas que se han diferenciado en los explantes, fueron medidas utilizando una regla graduada de 30 cm, por proyección desde la parte externa del frasco, para evitarse la contaminación

C. Grado de Fenolización de los explantes.

Se evaluó el grado de fenolización de los explantes, por cada ción en los tres medios de cultivo, según la escala propuesta por León en el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la UNSM-T

Grado	% fenolización	Interpretación
F0	0	No Fenolizado
F1	hasta 10	leve
F2	hasta 35	Media
F3	hasta 80	Alto
F4	hasta 100	Muerte

D. Fase de aclimatación.

D.1. Porcentaje de supervivencia de las plántulas con hojas completas; con hojas cortadas al 100% y 25% en la fase de aclimatación.

Se evaluó el porcentaje de supervivencia de las plántulas con hojas completas, con cámara húmeda adicional, sin enraizador (Rootonne), a los diez días.

Plántulas con las hojas totalmente cortadas, sin cámara húmeda adicional y con enraizador (Rootonne), a los diez días.

Plántulas con hojas cortadas en un 25% sin cámara húmeda adicional sin enraizador a los diez días.

D.2. Plantas en fase invernadero.

Luego de haber estado 15 días en la cámara húmeda las plantitas fueron trasladadas al invernadero, donde culminaron de aclimatarse satisfactoriamente.



Clon Inguirí en la fase de aclimatación en invernadero

4.4. DISEÑO EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se adecuó a un diseño en bloques completamente al azar con arreglo factorial 3x4 (medios de cultivo por clones) y cuatro repeticiones.

4.4.1. Medios de Cultivo

Cuadro N° 1: Componentes y dosis de cada uno de los medios en estudio

Componentes	Dosis / l de agua		
	M1	M2	M3
Murashige& Skoog MS 5519	1 sobre	1 sobre	1 sobre
Tiamina HCl	0,1 mg	1 mg	1 mg
Adenina hemisulfato – Adhs	40 mg	-----	-----
MYO-Inositol	100 mg	100 mg	
Ácido Nicotínico	0,5 mg	-----	0,5 mg
Sucrosa	30 g	41 g	30 g
Bencil Amino Purina – BAP	5 mg	5 mg	0,7 mg
Ácido Ascórbico	1 g		25 mg
Agua de coco – CW	150 ml	150 ml	
Glicina			2 mg
Kinetina			0,7 mg
Piridoxina			0,5 mg

M1: Medio de cultivo propuesto por León en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, UNSM-T.

M2: Medio de cultivo de Cronauer & Krikorian modificado

M3: Medio de cultivo de Gupta modificado (1986^a)

4.4.2. Procedimiento para Preparación del medio de cultivo

- En un vaso de vidrio o de plástico de 2 l de capacidad, medimos 1000 ml de agua destilada.
- Agregamos un sobre de MS 5519 o 20 ml de cada solución Stocks ABG (A: $\text{NH}_4\text{NO}_3 = 82,5 \text{ g / l}$, B: $\text{KNO}_3 = 95 \text{ g / l}$ y G: $\text{Na}_2 \text{ EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 1,865 + 1,39 \text{ g / l}$) más 5 ml de las soluciones Stock CDEF (C: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 88 \text{ g / l}$, D: $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 34 \text{ g / l}$, E: $\text{H}_3\text{BO}_3 + \text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} + \text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} + \text{KI} = 1,24 + 0,5 + 0,005 + 0,166 \text{ g / l}$ y F: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} + \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} + \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} = 3,38 + 74,0 + 0,005 + 1,725 \text{ g / l}$).
- enrazamos a 1500 ml, con agua destilada estéril.
- Separamos en 3 envases de 500 ml; Cada envase sirvió de solución patrón para un determinado medio en estudio.
- Luego adicionamos a cada solución separada los componentes nutritivos según su formulación.
- Después enrazamos a 1000 ml, cada uno de los envases destinado a cada medio.
- Cada medio de cultivo se ajusto aun pH aproximado de 5.8.
- Se distribuyo en frasco de 15 oz., 50 ml de solución, obteniendo 20 frascos por cada litro. Sumando un total de 60 frascos entre los 3 tratamientos.

- Todos los frascos con 50 ml de medio de cultivo se pasó a la esterilización en una autoclave a la temperatura de 121 ° C y una presión de 15 lb. por un periodo de 15 minutos.
- Después del enfriado, se almacenó en refrigeración a la temperatura de +/- 4 °C, hasta el momento de su uso.

4.4.3. Clones

Inguiri

Bellaco

Seda

Manzano

4.4.4. Análisis de varianza

Cuadro N° 2: Esquema del análisis de varianza

Fuente de variabilidad	G. L.	S.C.	C. M. E.	F. C
Tratamientos	12 - 1 = 11			
A (Medios del cultivo)	3 - 1 = 2			
B (Clones)	4 - 1 = 3			
A*B (m x C)	2 x 3 = 6			
Bloque	4 - 1 = 3			
Error	(12-1)(4 -1) = 33			
Total	(14 x 4) - 1 = 47			

4.4.5. Modelo matemático

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ij}$$

V. RESULTADOS



5.1. Evaluación de la fase del establecimiento del explante

5.1.1. Porcentaje de contaminación

Cuadro N° 3: Explante de *Musa sp.* Contaminado por medio de cultivo expresado en proporción

Clones de <i>Musa sp.</i>	Proporción de contaminación por medio de cultivo a 3 días de la siembra del explante		
	M1	M2	M3
Inguiri	0/4	0/4	0/4
Bellaco	0/4	0/4	0/4
Seda	0/4	0/4	0/4
Manzano	0/4	0/4	0/4

0: No contaminado 4: Número de repeticiones por clones de *Musa sp.*

5.1.2. Proporción de supervivencia de explantes a 15 días después de la siembra

Cuadro N° 4: Explantes de *Musa sp.* Con supervivencia por medio de cultivo expresado en proporción

Clones de <i>Musa sp.</i>	Proporción de supervivencia por medio de cultivo a 15 días de la siembra del explante		
	M1	M2	M3
Inguiri	4/4	4/4	4/4
Bellaco	4/4	4/4	4/4
Seda	4/4	4/4	4/4
Manzano	4/4	4/4	4/4

4/4: 100 % de explante vivos

5.2. Fase de Regeneración

5.2.1 Número de embrioides a las 8 semanas

Cuadro N° 5: Análisis de varianza para el número de embrioides por explante a 8 semanas después de la siembra (datos transformados Log (x+1))

Fuente de variabilidad	G. L.	S.C.	C. M. E.	F. C	Significación
Bloque	3	0,56	0,19	1,69	N. S.
A	2	20,76	10,38	93,46	**
B	3	0,40	0,13	1,19	N. S.
A*B	6	1,20	0,20	1,80	N. S.
Error	33	3,66	0,11		
Total	47	26,58			

N. S.: No significativo ** : Altamente significativo

X: 1,74 C. V.: 19,14 R²: 86,21 %

Cuadro N° 6: Prueba de Duncan para el Número Promedio de embrioides por explante desarrollados en medios de cultivo a 8 semanas después de la siembra. Datos originales

N° de Orden	Medios de cultivo	N° Promedio	Significación Duncan
1	M3	8,44	a
2	M2	6,88	a
3	M1	0,00	b

Cuadro N° 7: Prueba de Duncan para el Número Promedio de embrioides por explante de los clones de plátano a 8 semanas después de la siembra. Datos originales

N° de Orden	Clones	N° Promedio	Significación Duncan
1	Manzano	6,83	a
2	Seda	5,42	a
3	Bellaco	5,08	a
4	Inguiri	3,83	a

5.2.2. Número de plántulas por explante a las 20 semanas

Cuadro N° 8: Análisis de varianza para el número de plántulas por explante a 20 semanas después de la siembra (datos transformados Log (x+1))

Fuente de variabilidad	G. L.	S.C.	C. M. E.	F. C	Significación
Bloque	3	0,223	0,074	1,18	N. S.
A	2	0,299	0,150	2,37	N. S.
B	3	0,107	0,036	0,56	N. S.
A*B	6	0,084	0,014	0,22	N. S.
Error	33	2,083	0,063		
Total	47	2,796			

N. S.: No significativo

X = 1,076 C. V. = 23,34 % R² = 25,48

Cuadro N° 9: Prueba de Duncan de los medios de cultivo sobre la base del Número Promedio de plántulas por explante a 20 semanas después de la siembra

N° de Orden	Medios de cultivo	N° Promedio	Significación Duncan
1	M3	2,00	a
2	M2	0,33	ab
3	M1	0,00	b

Cuadro N° 10: Prueba de Duncan para el Número Promedio de plántulas por explante de los clones de plátano a 20 semanas después de la siembra. Datos originales

N° de Orden	Clones	N° Promedio	Significación Duncan
1	Inguiri	1,33	a
2	Bellaco	0,67	a
3	Seda	0,25	a
4	Manzano	0,08	a

5.2.3. Número de protocormos por explante a las 30 semanas

Cuadro N° 11: Análisis de varianza para el número de protocormos por explante a 30 semanas después de la siembra (datos transformados Log (x+1))

Fuente de variabilidad	G. L.	S.C.	C. M. E.	F. C	Significación
Bloque	3	0,520	0,173	1,12	N. S.
A	2	38,025	19,092	122,68	**
B	3	0,597	0,199	1,29	N. S.
A*B	6	1,108	0,185	1,19	N. S.
Error	33	5,114	0,155		
Total	47	45,356			

N. S.: No significativo **: Altamente significante

$X = 1,93$ $C. V. = 20,44\%$ $R^2 = 88,73$

Cuadro N° 12: Prueba de Duncan para el Número Promedio de protocormos por explante desarrollados en medios de cultivo a 30 semanas después de la siembra. Datos originales

N° de Orden	Medios de cultivo	N° Promedio	Significación Duncan
1	M3	15,00	a
2	M2	9,63	b
3	M1	0,00	c

Cuadro N° 13: Prueba de Duncan para el Número Promedio de protocormos por explante de los clones de plátano a 30 semanas después de la siembra. Datos originales

N° de Orden	Clones	N° Promedio	Significación Duncan
1	Manzano	10,42	a
2	Seda	8,50	a
3	Bellaco	7,67	a
4	Inguiri	6,92	a

5.3. Regeneración de plantas completas.

5.3.1. Número de plantas diferenciadas por cada clon.

Cuadro N° 14: Promedio del número de plántulas diferenciado por clon en cada medio de cultivo líquido.

Clones de <i>Musa sp.</i>	Promedio de plántulas diferenciadas por medio de cultivo a 20 semanas		
	M1	M2	M3
Inguiri	0	4	12
Bellaco	0	0	8
Seda	0	0	3
Manzano	0	0	1

4/4: 100 % de explante vivos

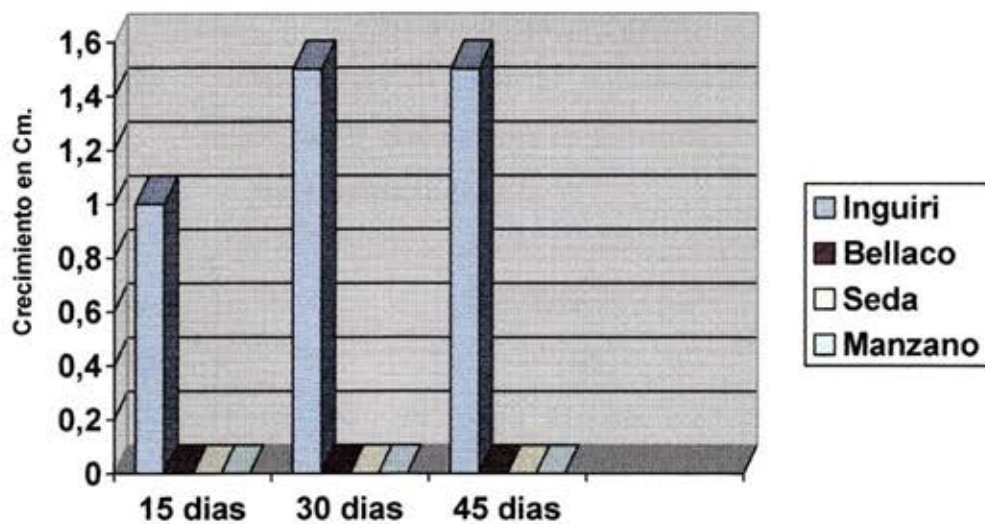
5.3.2. Velocidad de crecimiento en el medio líquido.

Cuadro N° 15: Velocidad de crecimiento de los clones diferenciados en medios de cultivo líquido durante tres evaluaciones a 15, 30 y 45 días, expresado en cm.

Clones de <i>Musa sp.</i>	Velocidad de crecimiento expresado en cm por medios de cultivo								
	M1			M2			M3		
	15	30	45	15	30	45	15	30	45
Inguiri	0,0	0,0	0,0	1,0	1,5	1,5	2,5	6,0	12,0
Bellaco	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	1,5	2,0
Seda	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	4,0	9,0
Manzano	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	3,0	6,0

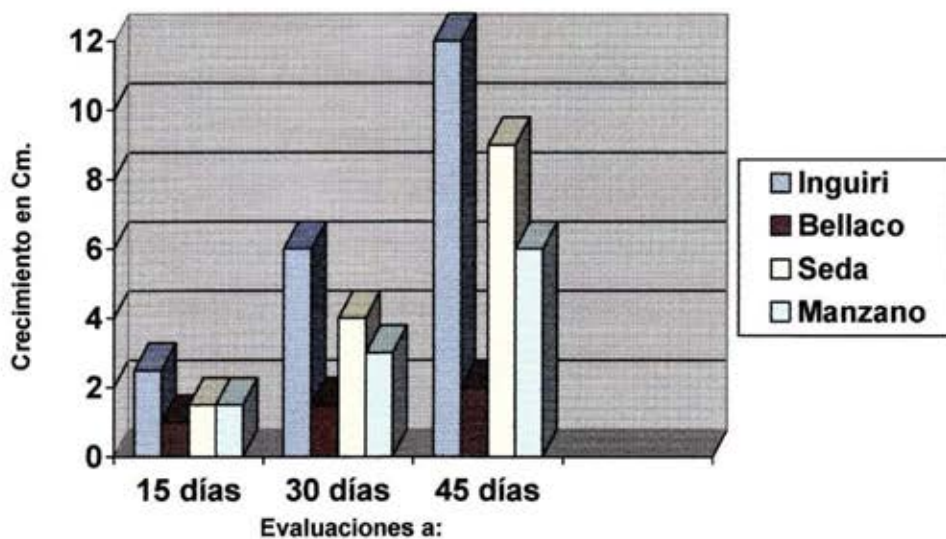
4/4: 100 % de explante vivos

- Velocidad de Crecimiento en M2



Evaluaciones a:

- Velocidad de Crecimiento en M3.



Evaluaciones a:

5.4. Número total de explantes fenolizados por clones

Cuadro N° 16: Número total de explantes fenolizados en 6 evaluaciones durante 90 días después de la siembra (La evaluación fue realizada cada 15 días)

Clones de <i>Musa sp.</i>	Total de explantes fenolizados por medio de cultivo expresados en grados durante 90 días											
	M1				M2				M3			
	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4	F1	F2	F3	F4
Inguiri	5	15	4	0	21	3	0	0	15	9	0	0
Bellaco	5	15	4	0	17	7	0	0	18	6	0	0
Seda	7	14	1	2	14	8	2	0	16	8	0	0
Manzano	7	11	4	2	16	8	0	0	21	3	0	0

5.5. Fase de Aclimatación

Cuadro N° 17: Porcentaje de supervivencia de las plántulas en la fase de aclimatación

Tratamientos de plántulas para su aclimatación	Evaluación a 10 días después de la siembra en sustrato		
	1 ensayo	2 ensayo	3 ensayo
Cama Húmeda	--	--	Cámara adicional
Enraizador (Rootonne)	1/10	--	--
% Corte de Hoja	100	25	0
% Supervivencia	0	75	90

VI. DISCUSION

6.1. Porcentaje de contaminación.

Durante los tres días después de la siembra de los explantes de los 4 clones de *Musa spp.*, no se ha observado contaminación del medio del cultivo ni de los explantes, esto nos afirma los resultados observados en el cuadro N° 3, lo cual confirma que las medidas de asepsia son necesarias para tener explantes libres de contaminantes.

6.2. Proporción de supervivencia de explantes a 15 días después de la siembra.

Los explantes de los 4 clones de *Musa spp.* Sembrados en los tres medios de cultivo estudiados, se han mantenido con tejido vivo en una proporción de 4/4 que equivale al 100 % como se muestra en el cuadro N° 4. Estos resultados han permitido continuar con el trabajo de investigación, conforme lo planteado para el proceso de micropropagación de *Musa spp.* por Robles (1998.)

6.3. Número de embrioides a las 8 semanas

El análisis de varianza para el número de embrioides por clones de *Musa spp.* a las 8 semanas, en los 3 medios de cultivo, nos dio como resultado un coeficiente de variabilidad de 19,4 % que esta dentro del rango de dispersión aceptable para trabajos agronómicos según Calzada (1970), su coeficiente de determinación fue de 86,21 % dándonos la eficiencia de la conducción del trabajo investigación. Según el cuadro N°4, se observa que

existió diferencia altamente significativa entre los medios de cultivos, no se observó diferencia estadística entre los explantes de cada clon, ni en la interacción de los medios de cultivos. Esto explica, que los nutrientes de los medios de cultivos han influido sobre las células de los protocormos para formar embrioides.

En el Cuadro N° 5, la prueba de Duncan para los tipos de medios de cultivo, ha dado como resultado, que el M3 y M2 no muestran diferencias estadísticas entre sí, diferenciándose del M1. Los explantes en el M3 y M2 han formado embrioides por explantes de cada clon sembrado, estos resultados tienen relación con los contenidos nutricionales para explantes de *Musa spp.* propuestos por Cronauer and Krikorian (1985), de igual modo con la de Murashige and Skoog (1986), a pesar haber hecho modificaciones en la dosificación de los contenidos de cada medio. El medio de cultivo para el presente ensayo propuesto por León, especialista del laboratorio de cultivo de Tejidos de la Universidad Nacional de San Martín, no dio buenos resultados en los clones ensayados a pesar de haber encontrado buenos resultados para clones de plátanos Sapinos de tipo bugloe.

En el cuadro N° 7, la prueba de Duncan para el número de embrioides obtenidos a 8 semanas después de la siembra de los explantes de cada clon. Nos muestra que no existen diferencias estadísticas entre los clones sembrados. La mejor respuesta en la formación de embrioides, obtuvieron los bananos manzanos y sedas que son propias para consumo en fruta, en segundo instancia se ubicaron los plátanos Bellaco é Inguiri.

6.4. Número de Plántulas por explante a las 20 semanas

El análisis de varianza para el número de plántulas por explante por clones de *Musa spp.* en los 3 medios de cultivos después de las 20 semanas, nos dio como resultado un coeficiente de variabilidad de 23,24 % que esta dentro del rango de dispersión aceptable para trabajos agronómicos como establece Calzada (1970). Su coeficiente de determinación fue de 25,48 %, este rango muy bajo de confiabilidad posiblemente sea por deficiencia nutricional o efectos fisiológicos provocado por acción de las hormonas. Según el cuadro N° 8, se observa que no existió diferencia significativa entre los medios de cultivo estudiados, explantes por clones, ni en la interacción de los medios de cultivo por explantes de cada clon. Considerando que las hormonas son termolábiles y al haber adicionado al medio de cultivo antes de la esterilización, es posible que ha causado poco efecto en la formación de plántulas de los clones estudiados.

En el Cuadro N° 9, la prueba de Duncan para los 3 medios de cultivos en estudio, ha dado como resultado, que el M3 y M2 no muestran diferencias estadísticas entre sí, diferenciándose el M3 del M1, pero M2 no se diferencia de M1. Algunos explantes han logrado diferenciar a plántulas en el M3 y M2 con un promedio de 2 y 0,33; una vez más nos confirma que los medios de cultivo tienen relación con los contenidos nutricionales para la formación de plántulas por explantes de *Musa spp.* propuestos por Cronauer and Krikorian (1985), de igual modo con la de Murashige and Skoog (1986), a pesar de haber hecho modificaciones en la dosificación de los contenidos de cada medio. Los explantes hasta las 16 semanas fueron repicados con una

frecuencia 15 días no obteniendo plántulas; pero cuando prolongamos los días de repique a 30 días se han obtenido las plántulas respectivas en M3 y M2, coincidiendo con lo descrito por Robles (1998) cuando menciona que a los 30 días después de sembrado los explantes se toman de color verde.

En el cuadro N° 10, en la prueba de Duncan para el número de plántulas obtenidas por explantes de cada clon, No se ha encontrado diferencias estadísticas entre sí. Formaron más plántulas los plátanos Inguiri y Bellaco, a pesar de mostrar menor número de embrioides. La formación de altas cantidades de embrioides, no es favorable para la formación de plántulas de bananos.

6.5. Número de protocormos a 30 semanas después de la Siembra en medio de cultivo de los Explantes de cada Clon

El análisis de varianza para el número de protocormos obtenidos por clones de *Musa spp.* en los 3 medios de cultivo, nos dio como resultado un coeficiente de variabilidad de 20,44 % que esta dentro del rango dispersión aceptable para trabajos agronómicos según Calzada (1970). Su coeficiente de determinación fue de 88,73 % dándonos la eficiencia de la conducción del trabajo investigación. Según el cuadro N° 11, se observa que existió diferencia altamente significativa entre los medios de cultivos, no se observó diferencia estadística entre los protocormos explantes de cada clon, ni en la interacción de los medio de cultivo por explantes de cada clon. Los medios de cultivo han influido con intensidad en la actividad celular formando protocormos.

En el Cuadro N° 12, la prueba de Duncan para los tipos de medios de cultivo, dio como resultado, que el M3 superó estadísticamente al M2 y M1 con un promedio de 15.00 protocormos, seguido del M2 con un promedio de 9,63 protocormos, no registrándose ningún protocormo en el M1; Estos resultados tienen relación con los contenidos nutricionales para explantes de **Musa spp.** Propuestos por Cronauer and Krikorian (1985), de igual modo con la de Murashige and Skoog (1986), a pesar haber hecho modificaciones en la dosificación de los contenidos de cada medio.

En el cuadro N° 13, nos muestra la prueba de Duncan para el número de protocormos obtenidos por explante de cada clon, en la cual no se ha encontrado diferencias estadísticas entre los clones sembrados, debido a que han absorbido la suficiente cantidad de nutrientes del medio de cultivo, que permitió incrementar su masa celular como consecuencia de su alta actividad fisiológica y bioquímica de sus células.

6.6. Número de plantas diferenciadas por cada clon en los medios de cultivo

En el medio de Cultivo M2, solo se ha diferenciado el clon Inguiri con 4 unidades, mientras que en M3 han diferenciado los 4 clones, ocupando el primer lugar el Inguiri con 12 clones, el bellaco con 8 clones, el seda con 3 clones y el Manzano con un clon; estos resultados nos muestran que los medios de cultivos no son iguales para cada clon, siendo necesario hacer ajustes en lo sucesivo en el contenido de medios de cultivo hasta encontrar un medio óptimo.

6.7. Velocidad de crecimiento de los clones diferenciados en los medios de cultivo

En el M2 el clon Inguiri tiene crecimiento rápido en los primeros 15 días (1,0 cm) disminuyendo esta velocidad en los 30 días en un 50 % (1,5 Cm), no mostrándose ningún incremento a los 45 días.

En el M3, todos los clones han experimentado crecimiento. El Inguiri ocupó el primer lugar en velocidad de crecimiento. Tanto en el Inguiri, seda y manzano, se nota un crecimiento proporcionalmente ascendente entre los 15 a 45 días. Mientras que el clon bellaco experimentó un crecimiento lento. Los nutrientes disueltos en líquidos son más fáciles de ser absorbidos por las células que fueron expuestas al ser sembradas en estos medios de cultivo.

6.8. Porcentaje de supervivencia de las plántulas a 10 días de la aclimatación

Se ha obtenido el 95 % de plántulas aclimatadas cuando no se cortaron las hojas y se adicionaron una cámara húmeda de menor tamaño confeccionado de mica. Cuando se cortaron el 25% de las hojas de las plántulas, con aplicación de un enraizador a una proporción de 1/10 y sin cámara adicional se ha obtenido una supervivencia de 75 %, y cuando se cortó el 100 % de las hojas sin cámara húmeda y con enraizador todas las plantas se han muerto. Estos tratamientos nos demuestran que las plántulas en el proceso de aclimatación requieren de un cuidado especial.

6.9. Grado de Fenolización de los explantes en los medio de cultivo

En el M1, todos lo clones muestran una fenolización de leve a media (F1 - F2) de fenolización. Mientras que el M2 y M3, todos los clones se han fenolizado de media a leve (F2 – F1), La escala ha sido propuesta por el laboratorio y precisa de mayor afinamiento. Esto se hizo para observar, como afecta el proceso de oxidación de los metabolitos de las células después de ser sometidos a los cortes histológicos, especialmente de los fenoles al ponerse en contacto con las fenoloxidasas en presencia del oxígeno.

VII. CONCLUSIONES.

- 7.1. Los medios de cultivo propuesto por Cronauer, Sandra and Krikorian (M2), y el Gupta modificado (M3) han permitido desarrollar a los explantes formando embrioides, protocormos y plántulas en los 4 clones de *Musa spp.* estudiados a partir de ápice floral.
- 7.2. Se ha obtenido mayor número de plántulas del Clon Inguiri en el medio de cultivo Gupta modificado (M3).
- 7.3. Los explantes de clones seda, manzano y bellaco han diferenciado a plántula en Gupta modificado (M3) a los 30 días después de cambiada la frecuencia de repique.
- 7.4. No se ha obtenido diferenciación de plántulas al hacer repique del explante cada 15 días.
- 7.5. Solo el clon Inguiri ha diferenciado en el Medio de cultivo Cronauer and Krikorian modificado.
- 7.6. La velocidad de crecimiento de las plántulas obtenidas de los cuatro clones ha progresado proporcionalmente en el orden siguiente: Inguiri, Seda, Manzano y Bellaco.
- 7.7. El Grado de fenolización en todos los clones estudiados fue de F1, F2, F3 y F4, tuvieron mayor frecuencia la F1 y F2, variando sus tendencias de acuerdo al medio de cultivo.
- 7.8. Las yemas masculinas del clon bellaco por su forma lanceolada en su mayoría terminan en una inflorescencia en lugar de domo apical hecho que imposibilita la obtención del material vegetal.
- 7.9. Al final se ha obtenido clones de *Musa spp.* libres de patógenos a nivel de laboratorio e invernadero.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda:

- 8.1. Continuar con trabajos de investigación similares en los clones de Inguiri, Bellaco, Seda, Manzano y otros del género *Musa* con la finalidad de estabilizar medios de cultivo que sean adecuados.
- 8.2. Probar diferentes dosis de Bencil Amino Purina – BAP en los medios de cultivo, para dotarle de un adecuado medio al explante para su diferenciación y crecimiento.
- 8.3. La universidad debe poseer un banco de germoplasma de los diferentes cultivos tropicales, para su conservación y sirvan de material base para el cultivo de Tejidos Vegetales.
- 8.4. Prolongar el periodo de repique de los explantes sembrados, por que facilita su diferenciación con mayor facilidad y en menor tiempo.
- 8.5. Para mantener explantes sin diferenciar es necesario ensayar diferentes frecuencias en el repique (Ejemplo cada 15 días).
- 8.6. Para disminuir el grado de fenolización es necesario considerar dosis bajas de un antioxidante (Ejemplo: ácido ascórbico).
- 8.7. Los explantes del clon bellaco debe extraerse de los hijuelos, por que es difícil conseguir un explante de la bellota, que cumpla con las características deseadas, ya que en lugar de encontrar un domo apical se finaliza en una inflorescencia masculina.

IX. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales de la Universidad Nacional de San Martín, con el Objeto de evaluar la eficiencia de 3 medios de cultivo y sus diferentes fases en la micropropagación de 4 Clones de *Musa spp.* a partir de ápices florales, para obtener plantas exentas de patógenos. Se adecuó a un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial de 3x4 (medios de cultivo por clones) y cuatro repeticiones.

Los clones a los 15 días de sembrados en medios de cultivo mostraron el 100 % de explantes vivos sin contaminación; los medios de cultivo donde se formaron mayor número de embrioides 6,88 a 8,44 fueron el M2 y M3; los 4 clones han formado embrioides; discriminadamente en el clon manzano hubo mayor formación de embrioides con 6,83.

A 20 semanas de sembrados los explantes mostraron resultado de 2 plántulas promedio en el medio de cultivo M3 y el clon Inguiri formó la mayor cantidad de plántulas 1,33 por explante. En relación con la formación de los protocormos el medio de cultivo M3 formó mayor número (15) y con respecto a los demás clones, el manzano se destacó con 10,42.

En el medio de cultivo M3 formaron mayor número de plántulas diferenciadas por clon (12). También los clones diferenciados en el medio de cultivo M3 crecieron a mayor velocidad siendo el Clon Inguiri el que sobresale con 12 cm en 45 días; frente a 1,5 cm del mismo Clon en el M2.

En todos los medios se observó fenolización, destacándose los grados F1 y F2 (10 y 35 %) y en mayor grado en aquellos medios donde se usó alta concentración y donde no se usó antioxidante (1 g. y 0 g./l. de Ácido Ascórbico), obteniendo los mejores resultados a bajas concentraciones (25 mg./l. Ácido Ascórbico).

IX. SUMMARY

The following research work was carried out at the Cultivation Laboratory for Vegetable Tissues of the San Martin National University, in order to evaluate the efficiency of three cultivation environments, and its different phases on the micro-propagation of 4 *Musa spp.* clones. Every one was taken from a floral apex, with the purpose to obtain plants free of pathological effects. It was performed within a picked completely at random block design, under a factorial array of 3x4 (environments by clones), with four repeats.

After 15 days from being seeded, they showed the 100 % alive free of contamination. The M2 and M3 environments showed a bigger number of formed embryoids from 6, 88 to 8, 44. All 4 clones formed embryoids, but exceptionally the apple clon formed the most of them, 6,83.

After 20 week from seeded, 2 was average shown by the cut parts of the M3, and the Clon Inguiri formed the greatest amount of plants per cut part 1, 33. In relation with the formation of protocorms, the M3 environment formed the biggest number of them (15) in comparison with the other. The apple showed up with 10, 42.

Within the M3 environment are found the greatest amount of differentiated plants per clon (12). They also grew faster than the others, being the Inguiri clon the one that surpassed the 12 cm in 45 days, in comparison with 1, 5 for its analog clon from the M2.

All environments showed fenolization, at F1 and F2 (10 and 35%), and in a greater degree inside the environments where a higher concentration was used and where the antioxidant (1 gr. and 0 gr./lt. Of Ascorbic Acid) was not used, obtaining the best results at lower concentrations (25 mgr/ lt. of Ascorbic Acid).

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANGUIZ, R. CUEVA, A. Y LLAQUE. 1998. Resumen XV del Congreso de Peruano de Fitopatología. Pucallpa-Ucayali 11-12 p.
2. AGRIOS, G. 1995. Fitopatología. Segunda Edición. Traducida por Guzmán, M. de La publicación en Ingles con el Título de Plant Pathology, Third Edition. Editorial LIMUSA. México 838 p.
3. CALZADA. B. 1982. Métodos Estadísticos para la Investigación. Editorial Milagros S. A. Lima- Perú. 644 p.
4. CHAMPION, J. 1968. El Plátano – Técnicas Agrícolas y Producciones Tropicales. Editorial BLUME. Barcelona, España. 11 – 14 p.
5. CRONAUER, SANDRA S. AND A. D. KRIKORIAN. 1984a. Rapid multiplication of banana and plantain by in vitro Shoot Tip Culture HortSci., 19: 234-235.
6. CRONAUER, SANDRA S. AND A. D. KRIKORIAN. 1984b. Multiplication of *Musa* From excised Stem Tips. Ann. Bot., 53:321-235
7. CRONAUER, SANDRA S. AND A. D. KRIKORIAN. 1985. Reinitiation of vegetative growth from aseptically culture terminal floral apex of banana. Amer. J. Bot., 72: 1598-1601.
8. FIGUEROA Y GEORGE. 1992. El Cultivo del Plátano en el Perú. FUNDEAGRO. IICA. Lima. FLORES, E. 1986. Resumen del XIV Congreso Peruano de Fitopatología. Lambayeque, Perú. p 44.
9. HOLDRIDGE, L. R. 1978. Ecología basada en zonas de vida. IICA. San José. – Costa Rica. 216 p.

10. MORAN, M. 1986. Seminario Taller Sobre Producción del Plátano en la Selva Peruana. Editorial IICA. Lima – Perú. p 62-67.
11. ROBLES, M. 1998. La Biotecnología en el Control de La Sigatoca Negra. INIFAP. Curso Taller Manejo Integrado de la Sigatoca Negra. Manzanillo, Colima, México. P. 90-101.
12. VUYLSTEKE, D. R. 1989. Shoot-Tip Culture for the Propagation, Conservation and Exchange of *Musa* Germplasm. International Board for Plant Genetic Resources – IBPGR. Rome 55 pp.

XI. ANEXOS

ANEXO 1: CUADRO DE COSTOS.

RUBRO	UNIDAD	CANTIDAD	P.U.(s/.)	SUB-TOTAL
1. MANO DE OBRA.				
Recolección de muestras	Jornal	10	10,00	100,00
2. BIENES				
2.1. Materiales de Oficina				
Papel Bond A4 de 80 g.	Millar	1	40,00	40,00
Borrador	Unidad	3	0,50	1,50
Lápices	Unidad	6	0,50	3,00
Rollos Fotográficos	Unidad	5	11,50	57,50
Pilas	Pares	12	4,00	48,00
2.2. Materiales y Reactivos				
Placas Petri	Unidad	60	11,30	680,00
Pinzas	Unidad	44,20	5	221,00
Hojas de Bisturí	Unidad	200	1,02	204,00
Algodón	Kg.	12	10	120,00
Alcohol	l.	15	10	150,00
Lejía	l.	8	5	40,00
Medios de Cultivo MS	l.	40	16,25	605,00
2.3. Otros				
Material de Colección				250,00
Agroquímicos				300,00
3. SERVICIOS				
Revelados	Rollos	5	18	90,00
Tipeo e impresión	Unidad	300	1	300,00
Encuadernado	Unidad	5	30	150,00
Movilidad (Recolección)	Pasaje	20	10	200,00
COSTO TOTAL				3560,00

ANEXO 2: DISTRIBUCIÓN DEL LABORATORIO POR AREAS

AREA DE LAVADEROS



AREA DE ESTERILIZACIÓN



AREA PRODUCCION DE
AGUA ESTERIL



AREA DE SIEMBRA



AREA DE INCUBACIÓN



AREA DE ACLIMATACIÓN

