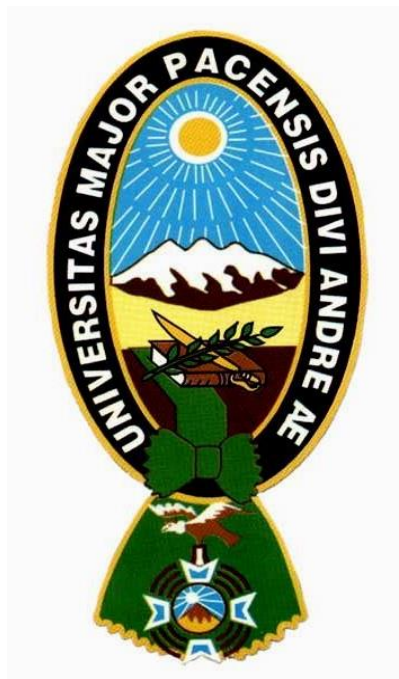


**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**PROGRAMA DE INGENIERÍA EN AGRONOMÍA TROPICAL**



**TESIS DE GRADO**

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DESINFECCIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO EN LAS FASES DE INTRODUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *In vitro* DEL CULTIVO DE BANANO (*Musa* sp. AAA), VARIEDAD GRAN NAINÉ EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SAPECHO.**

**MARIELA FILOMENA MAMANI QUISBERT**

**La Paz – Bolivia**

**2022**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**PROGRAMA DE INGENIERÍA EN AGRONOMÍA TROPICAL**

**EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE DESINFECCIÓN Y MEDIOS DE CULTIVO EN LAS FASES DE INTRODUCCIÓN Y ESTABLECIMIENTO *In vitro* DEL CULTIVO DE BANANO (*Musa* sp. AAA), VARIEDAD GRAN NAINÉ EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL SAPECHO.**

*Tesis de grado*  
*Presentado como requisito*  
*para optar el Título de*  
*Ingeniero Agrónomo*

**MARIELA FILOMENA MAMANI QUISBERT**

**Asesor(es):**

Ing. Casto Maldonado Fuentes

\_\_\_\_\_

Ing. Marco Antonio Echenique Quezada

\_\_\_\_\_

**Tribunal Examinador:**

Ing. Celso Ticona Quispe

\_\_\_\_\_

Ing. M. Sc. Fernando Manzaneda Delgado

\_\_\_\_\_

**APROBADO**

**Presidente Tribunal Revisor:**

\_\_\_\_\_

La Paz – Bolivia  
2022

## **DEDICATORIA**

A Dios, por haberme permitido alcanzar una meta más en la vida, a mi familia por el apoyo, confianza, y paciencia, en especial a mi madre Celestina Quisbert Intimayta y mi padre Miguel Mamani Puña por los valores inculcados y haber estado a mi lado apoyándome en cada etapa de mi formación profesional.

## **AGRADECIMIENTO**

Mis más sinceros agradecimientos:

A Dios por darme la oportunidad de vivir y hacer posible este momento. A la Facultad de Agronomía de la Universidad Mayor de San Andrés, por haberme abierto sus puertas y dado la oportunidad de poder formarme como profesional.

A los docentes que formaron parte del Programa de Ingeniería en Agronomía Tropical dependiente de la Facultad de Agronomía por sus enseñanzas, y valores inculcados en mi etapa de formación académica.

A todo el personal técnico, administrativo y trabajadores de la Estación Experimental de Sapecho por el apoyo incondicional y orientación en todo el proceso que se llevó a cabo el trabajo de investigación.

A mis asesores Ing. Casto Maldonado Fuentes por guiarme y brindarme todo su apoyo para la culminación del presente trabajo y al Ing. Marco Antonio Echenique Quezada, encargado del área de Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental de Sapecho, por haberme apoyado en todo el proceso de la investigación brindándome su conocimiento, experiencia, confianza y amistad.

A mis revisores Ing. Celso Ticona Quispe e Ing. M. Sc. Fernando Manzaneda Delgado, por aportar en el enriquecimiento del trabajo de investigación mediante las correcciones y sugerencias hechas en la revisión de tesis.

Al Ing. M. Sc. Johnny Ticona Aliaga (f) quien fue como mi segundo padre y por transmitirme sus conocimientos y guiarme en toda la presente investigación, además de ofrecerme su amistad incondicional, que hoy Dios lo guarde en su gloria.

A mis compañeros tesistas; Milenka, Mary, Delia, Miriam, Mariana, Susi, Zulema, Celso, Andrés, Jorge, Roger, Carlos, Luis, Franklin, Isaías, Adalid, Eloy, Milton y Juan. Quienes con su apoyo y amistad hicieron posible la culminación del presente trabajo de tesis.

## INDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	i
AGRADECIMIENTO .....	ii
INDICE GENERAL.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	vi
INDICE DE TABLAS.....	viii
RESUMEN .....	ix
SUMMARY.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
2.1. Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos Específicos.....	3
3. REVISION BIBLIOGRAFICA .....	4
3.1. Origen y distribución del cultivo de banano .....	4
3.2. Descripción de las musáceas .....	4
3.3. Descripción botánica.....	5
3.3.1. Sistema radicular .....	6
3.3.2. Cormo.....	6
3.3.3. Tipos de cormo o hijuelos .....	6
3.3.4. Pseudotallo y sistema foliar .....	7
3.3.5. Inflorescencia y racimo .....	8
3.3.6. Fruto .....	8
3.4. Clasificación taxonomía .....	9
3.5. Variedades de banano.....	9
3.5.1. Gran Naine (AAA).....	9
3.5.2. Características de la variedad Gran Naine .....	9
3.5.3. Gros Michel, sinonimia local “Guayaquil” .....	10
3.5.4. Green Red, sinonimia local “Manzano Amarillo” .....	10
3.5.5. Red, sinonimia local “Manzano Rojo” .....	10

3.5.6. Sucrier, sinonimia local “Motakusillo” .....	11
3.5.7. Sinonimia local “Sedita” .....	11
3.5.8. Sinonimia local “Isla” .....	11
3.6. Propagación del banano .....	12
3.7. La Biotecnología en el mejoramiento de los cultivos .....	12
3.8. Biotecnología vegetal.....	13
3.8.1. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i> .....	13
3.8.2. Micro propagación .....	14
3.8.3. Tipo de explante .....	16
3.8.4. Vías de regeneración.....	17
3.8.4.1. Organogénesis .....	17
3.8.4.2. Vía embriogénesis somática.....	18
3.8.5. Factores que afectan al cultivo <i>in vitro</i> .....	20
3.8.5.1. Asepsia .....	20
3.8.5.2. Oxidación.....	21
3.8.6. Métodos de desinfección .....	21
3.8.7. Medio de cultivo .....	22
3.8.7.1. Composición del medio de cultivo .....	22
3.8.1. Cultivo de tejidos <i>in vitro</i> en banano .....	25
4. MATERIALES Y METODOS.....	27
4.1. Localización .....	27
4.1.1. Ubicación geográfica .....	28
4.1.2. Laboratorio de Biotecnología Vegetal Estación Experimental Sapecho – UMSA.....	28
4.2. Materiales .....	29
4.2.1. Material genético .....	29
4.2.2. Material de Laboratorio .....	30
4.2.3. Equipos de laboratorio .....	31
4.3. Metodología .....	32
4.3.1. Preparación de medios.....	32
4.3.1.1. Preparación de la solución Stock.....	32

4.3.1.2. Preparación del medio de cultivo de introducción y establecimiento .....	32
4.3.2. Introducción y establecimiento a condiciones <i>in vitro</i> .....	33
4.3.2.1. Selección del material vegetal .....	33
4.3.2.2. Desinfección del material vegetal .....	34
4.3.2.3. Cultivo de ápices meristemáticos.....	36
4.3.2.4. Establecimiento de explantes.....	37
4.3.2.5. Desarrollo de la <i>vitro</i> planta .....	37
4.3.3. Diseño experimental .....	39
4.3.3.1. Variables de respuesta .....	40
4.3.4. Transformación de datos .....	42
4.3.5. Análisis de costos parciales .....	43
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	44
5.1. Fase de introducción del material vegetal a condiciones <i>in vitro</i> . .....	44
5.1.1. Porcentaje de contaminación.....	44
5.1.1.1. Contaminación por hongos.....	44
5.1.1.2. Contaminación por bacteria.....	45
5.1.1.3. Porcentaje de oxidación fenológica .....	47
5.1.1.4. Porcentaje de sobrevivencia.....	49
5.2. Fase de establecimiento del material vegetal a condiciones <i>in vitro</i> .....	50
5.2.1. Altura de la <i>vitro</i> planta .....	50
5.2.2. Diámetro de la <i>vitro</i> planta .....	51
5.3. Análisis de costos .....	53
5.3.1. Material vegetal. ....	53
5.3.2. Método de desinfección.....	53
5.3.3. Medios de cultivo. ....	54
6. CONCLUSIONES .....	56
7. RECOMENDACIONES.....	57
8. BIBLIOGRAFÍA.....	58
ANEXOS .....	62

## INDICE DE FIGURAS

	pág.
<b>Figura 1.</b> Morfología de la planta de Musa sp.....	6
<b>Figura 2.</b> Proceso para el cultivo de ápices en mussa sp.....	26
<b>Figura 3.</b> Ubicación del municipio de Palos Blancos. ....	27
<b>Figura 4.</b> Ubicación Estación Experimental Sapecho.....	28
<b>Figura 5.</b> Hijuelos de banano Gran Naine (B) Parcela experimental (A). ....	30
<b>Figura 6.</b> Materiales de Laboratorio.....	31
<b>Figura 7.</b> Equipos de laboratorio.....	31
<b>Figura 8.</b> Preparación de la solución Stock .....	32
<b>Figura 9.</b> Medio de cultivo I(A), medio de cultivo II(B), medio de cultiv.o III(C).....	33
<b>Figura 10.</b> Material vegetal (hijuelos de banano).....	33
<b>Figura 11.</b> Desinfección del material vegetal.....	34
<b>Figura 12.</b> Desinfección preventiva de cormos (Agua corriente y detergente). ....	34
<b>Figura 13.</b> Primera desinfección en soluciones desinfectantes. ....	35
<b>Figura 14.</b> Segunda desinfección en soluciones desinfectantes. ....	36
<b>Figura 15.</b> Cultivo de ápices meristemáticos. ....	36
<b>Figura 16.</b> Establecimiento de meristemas apicales.....	37
<b>Figura 17.</b> Subcultivo de yemas meristemáticas. ....	38
<b>Figura 18.</b> Proceso experimental.....	38



<b>Figura 19.</b> Comparación de medias del Factor A para porcentaje de contaminación por Hongo.....	45
<b>Figura 20.</b> Comparacion de medias de contaminacion por bacteria en los metodos de desinfeccion.....	46
<b>Figura 21.</b> Comparacion de medias para el porcentaje de oxidacion fenologica en los metodos de desinfeccion. ....	46
<b>Figura 22.</b> Comparación de medias para el porcentaje de oxidación fenológica en los Medios de cultivo.....	48
<b>Figura23.</b> Comparación de medias para el porcentaje de sobrevivencia en diferentes métodos de desinfección. ....	50
<b>Figura 24.</b> Comparación de medias para altura de las <i>vitro</i> plantas en diferentes medios de cultivos.....	51
<b>Figura 25.</b> Comparación de medias para diámetro de la <i>vitro</i> planta en diferentes medios de cultivos.....	52

## INDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación Taxonómica del Banano.....	9
<b>Tabla 2.</b> Promotores de crecimiento o Fito reguladores de plantas.....	24
<b>Tabla 3.</b> Materiales de laboratorio.....	30
<b>Tabla 4.</b> Primera Desinfección de los meristemas apicales.....	35
<b>Tabla 5.</b> Segunda Desinfección .....	36
<b>Tabla 6.</b> Factores de estudio.....	39
<b>Tabla 7.</b> Descripción de los tratamientos. ....	40
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza del porcentaje de contaminación por hongos.....	44
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza del porcentaje de contaminación por bacteria.....	47
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza del porcentaje de oxidación fenológica. ....	47
<b>Tabla 11.</b> Análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia.....	49
<b>Tabla 12.</b> Análisis de varianza de altura de las vitroplantes.....	50
<b>Tabla 13.</b> Análisis de varianza de diametro de las vitroplantes.....	53
<b>Tabla 14.</b> Costos parciales para los metodos de desinfeccion .....	53
<b>Tabla 15.</b> Análisis de costos de medios de cultivo expresado en bolivianos (Bs).....	55

## RESUMEN

En Bolivia la producción de banano, se ve limitada por diferentes problemas entre estos podemos mencionar a las enfermedades provocadas por hongos, bacterias y virus, las enfermedades más importantes causadas por hongos se encuentran la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*), Sigatoka Amarilla (*Mycosphaerella musicola*) y el Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum*). Una forma de obtener plantas libres de patógenos es a través del cultivo de tejidos *in vitro*. El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar tres métodos de desinfección y tres medios de cultivo para la introducción y establecimiento *in vitro* banano (*Musa* sp. AAA) Var. Gran Naine en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Sapecho. El trabajo, se realizó tres métodos de desinfección propuestos por: método I EES, (2018), método II Ubilla, (2016), método III; Medina *et. al*, (2015). Las variables de estudio fueron: la contaminación por hongos, bacterias, oxidación, sobrevivencia y contaminación total. Los medios de cultivo que se ensayaron fueron: medio de cultivo I CATIE, (2016), medio de cultivo II; Colmenares y Giménez (2001), medio de cultivo III Medina *et. al*, (2015), tomando como variable de respuesta la altura y diámetro del explante. El análisis estadístico utilizado para la evaluación de los datos fue el Diseño Completamente a Azar (D.C.A.) con arreglo Bi factorial (métodos de desinfección y medios de cultivo) con tres repeticiones por tratamiento y 4 unidades experimentales por repetición. De acuerdo a los resultados obtenidos, con el método II; propuesto por Ubilla, (2016), la contaminación por hongos fue del 39% siendo la más eficiente; mientras que con el método de desinfección III, Medina *et. al*, (2015), se obtuvo una menor contaminación de bacterias y oxidación fenólica, con 38,8% y 39% de contaminación respectivamente; asimismo con respecto al grado de sobrevivencia de explantes con este método III fue la más eficiente (61%); con respecto a los medios de cultivo para la altura se encontró en el medio de cultivo II propuesto por Colmenares y Giménez (2001), con 1,7 mm. En cuanto al diámetro el mejor resultante fue el medio de cultivo I propuesto por CATIE (2016), con 1,65 mm. La evaluación de los costos parciales se obtuvo un costo menor para método de desinfección III con un total de 21 Bs. En cuanto para los costos parciales en preparación de medios de cultivo se tomó en cuenta Bs/Lt, donde el medio de cultivo II presentó un costo menor de 70 Bs.

## SUMMARY

In Bolivia, banana production is limited by different problems, among these we can mention diseases caused by fungi, bacteria and viruses, the most important diseases caused by fungi are Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*), Yellow Sigatoka (*Mycosphaerella musicola*) and Panama disease (*Fusarium oxysporum*). One way to obtain pathogen-free plants is through in vitro tissue culture. The present work was carried out with the objective of evaluating three disinfection methods and three culture media for the in vitro introduction and establishment of banana (*Musa* sp. AAA) Var. Gran Naine at the Biotechnology Laboratory of the Sapecho Experimental Station. The work carried out three disinfection methods proposed by: method I EES, (2018), method II Ubilla, (2016), method III; Medina *et. al*, (2015). The study variables were: contamination by fungi, bacteria, oxidation, survival and total contamination. The culture media that were tested were: culture medium I CATIE, (2016), culture medium II; Colmenares and Giménez (2001), culture medium III Medina *et. al*, (2015), taking as response variable the height and diameter of the explant. The statistical analysis used for the evaluation of the data was the Completely Random Design (D.C.A.) with a Bi-factorial arrangement (disinfection methods and culture media) with three repetitions per treatment and 4 experimental units per repetition. According to the results obtained, with method II; proposed by Ubilla, (2016), fungal contamination was 39%, being the most efficient; while with the disinfection method III, Medina *et. al*, (2015), a lower contamination of bacteria and phenolic oxidation was obtained, with 38.8% and 39% contamination, respectively; also with respect to the degree of survival of explants with this method III was the most efficient (61%); Regarding the culture media for height, it was found in the culture medium II proposed by Colmenares and Giménez (2001), with 1.7 mm. In terms of diameter, the best result was culture medium I proposed by CATIE (2016), with 1.65 mm. The evaluation of the partial costs obtained a lower cost for the disinfection method III with a total of 21 Bs. As for the partial costs in preparation of culture media, Bs/Lt was taken into account, where the culture medium II presented a cost less than 70 Bs.

## 1. INTRODUCCIÓN

El banano pertenece a la familia de las *musáceas*, que representa uno de los cultivos más importantes en el mundo entero; más de 400 millones de personas de los trópicos y subtrópico dependen de la producción de este cultivo, siendo una fruta originaria del sureste del continente asiático, es de gran importancia alimentaria y económica a nivel mundial, los principales países productores de banano son: India, China continental, Filipinas, Brasil y Ecuador (INEC, 2011).

Entre los años 2012 a 2014, se ha observado una disminución en producción y rendimiento del cultivo en América del Sur, esto debido principalmente al cambio climático en los últimos años, que generó la aparición de plagas y enfermedades (INIAP, 2014).

En Bolivia la variedad tradicional es Mokotaki, sin embargo, se está haciendo gran énfasis en la transición a las variedades Williams, Gran Enano, Guayaquil y Fhiaz. La producción de banano es abundante principalmente en el trópico de Cochabamba (Chapare), en el norte de La Paz y Santa Cruz. (PROMUEVE BOLIVIA, 2014).

Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Ministerio de Desarrollo Rural y Tierras, en el año agrícola 2015 a 2016 se produjo banano y plátano para cocción en 60.298 hectáreas; 19.837 hectáreas de banano y 40.461 hectáreas de plátano para cocinar. (INE, 2015).

La zona de Alto Beni se caracteriza por su excelente producción de banano libre de productos químicos, esta producción se la realiza a través de los años de forma empírica, sin embargo, debido a sus altos requerimientos nutricionales la productividad de banano por hectárea disminuye año tras año (Ortega, 2011).

Las variedades de bananos comerciales más utilizadas en la actualidad, no producen semilla, es decir son triploides estériles, que solamente se pueden propagar por vía asexual por medio de brotes o “hijuelos” de la planta, este tipo de propagación es lenta y la tasa de multiplicación es baja, esto ayuda la diseminación de enfermedades y plagas a los nuevos cultivos (Vargas, 2012).

El banano tradicionalmente se propaga en forma vegetativa (cormos), estos son separado para reproducirlos, unos de los principales problemas que presenta este método de propagación, es que la tasa de multiplicación es muy baja. Por esta razón la propagación *in vitro* es una de las alternativas para la obtención de plantas sanas libre de patógenos (Ubilla, 2016).

La propagación *in vitro* es una técnica en la cual se extrae una pequeña parte de la planta (explante) y se cultiva en condiciones asépticas en un medio de cultivo, formado por macronutrientes, micronutrientes, carbohidratos, vitaminas, reguladores de crecimiento y a veces aminoácidos, todo esto debe estar bajo ambiente controlado; esta técnica comprende las etapas de iniciación o establecimiento, multiplicación, enraizamiento y endurecimiento (Ortega, 2011)

En Bolivia la aplicación de las técnicas biotecnológicas se ha visto limitadas por los altos costos, desde la implementación en laboratorio a la producción en campo, otro factor que afecta es el desconocimiento por parte de los productores en usar la biotecnología como una herramienta para aumentar los niveles de producción y productividad. (Quispe, 2010)

Actualmente el área de producción de la región de Alto Beni, se ve afectada debido a la presencia de enfermedades causada por diversos microorganismos especialmente hongos y bacterias siendo estos uno de los principales problemas de mayor limitación seguido del mal manejo, y la fertilidad del suelo que acortan el abastecimiento de este producto en el mercado local y nacional.

Esta es la razón por la que se necesita buscar alternativas para incrementar la producción de plantas con mayor sanidad ante los problemas de presencia de enfermedades en ambientes reducidos, de esta manera ofrecer a los productores una alternativa para mejorar sus rendimientos y obtener plantas de mayor calidad en su productividad.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Evaluar tres métodos de desinfección y tres medios de cultivo para banano (*Musa* sp. AAA) Var. Gran Naine en la fase de introducción y establecimiento *in vitro*.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Establecer un método de desinfección para la introducción del banano a condiciones *in vitro*.
- Determinar el medio de cultivo para el establecimiento *in vitro* del banano variedad Gran Naine.
- Determinar el análisis parcial de los costos por tratamiento.

### **3. REVISION BIBLIOGRAFICA**

#### **3.1. Origen y distribución del cultivo de banano**

El banano geográficamente es originario del sureste asiático y el Archipiélago malayo, actualmente hay dos grupos de banano comercial que son el gros Michel y Cavendish AAA. (Vargas, 2012)

Actualmente, se reconoce como el cultivo más difundido del mundo y su distribución se extiende a Brasil, Ecuador, Costa Rica, Jamaica, India, Antillas francesas e inglesas, Filipinas, Taiwán, Australia, Islas Canarias, Madeira y África. Dentro de la familia de las *Musáceas*, el género *Musa* ha adquirido importancia en la alimentación humana a nivel mundial; de él derivan dos tipos específicos: los plátanos de cocción y los bananos que se consumen crudos. (Rivera, 2011)

El banano variedad Banano Gigante (Gran Naine), es una planta herbácea perteneciente al género *Musa* y familia de las *Musáceas*. El banano comestible se origina a través de una serie de mutaciones y cambios genéticos, a partir de especies silvestres no comestibles, *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, de fruto pequeño con numerosas semillas, los bananos vigorosos poseen sus frutos grandes y carecen de semilla. Debido a que el banano no produce semillas fértiles, se propaga vegetativamente. (Condori, 2017)

#### **3.2. Descripción de las musáceas**

Las musáceas son herbáceas de gran altura con bases foliares unidas, que forman un pseudotallo y los secundarios en posición pinnada Inflorescencias grandes, con brácteas vistosas; flores fértiles, uno de ello a menudo convertido en estaminodio. El fruto es una baya o capsula muy carnosa, sin semillas. (Araya, 2008)

Las musáceas se las describe como planta herbáceas monocotiledóneas, perennes. Se las considera porque después de la cosecha, la parte aérea muere y no tiene componentes leñosas, se considera que es un cultivo perene por que los hijos



emergen de la planta madre para remplazar las partes aéreas muertas. (Robinson, 2012)

De los tallos subterráneos, brotan pseudotallos aéreos, formados por las bases envolventes de las hojas, por cuyo centro crecen los ejes florales. El tallo subterráneo se compone de cormos o rizomas cortos de crecimiento apical. El primer corno desarrolla un pseudotallo aéreo y un eje floral, subterráneamente una o más yemas, que a su vez se desarrollan en cormos. (Llanqui, 2011)

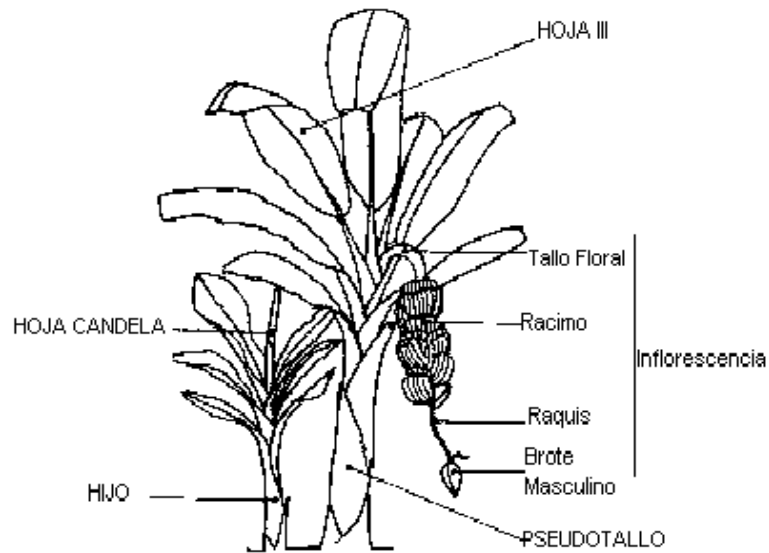
La planta crece así en sentido longitudinal o radial, de modo que entorno al primer pseudotallo, hay varios hijos o brotes, de diversas formas y edades. Uno o más de ellos producirán flores cuando el primer tallo se seque y se desintegre, otros se mantendrán sin desarrollarse como los denominados “hijos de agua” que se alimentan en el cultivo. (León, 1968) mencionado por (Ubilla, 2016).

### **3.3. Descripción botánica**

En general, los plátanos son plantas herbáceas, perteneciente a la familia de las musáceas, con pseudotallo aéreos que se originan de cormos carnosos en los cuales se desarrollan numerosas yemas laterales (hijos). Las hojas tienen una distribución helicoidal. La inflorescencia es terminal y crece a través del centro del pseudotallo hasta alcanzar la superficie.

En el transcurso de los años, se desarrolló variedades de banano gigante como el Galil12 y Galil-10. Estas variedades superiores contienen cualidades que ayudan a mejorar el rendimiento, facilidad de cosecha, y la calidad de la fruta. Además, presenta un sistema radicular fibroso, grueso y succulento, alcanzando un largo de 50 a 150 centímetros. El pseudotallo alcanza un grosor de 30 a 70 centímetros siendo de un color café. (Quispe, 2010)

A continuación, se describen las características morfológicas más sobresalientes de las estructuras vegetativas que constituyen las plantas de *musa sp.*



**Figura 1:** Morfología de la planta de Musa sp

Fuente: (Quispe, 2010)

### 3.3.1. Sistema radicular

El sistema radicular es adventicio, las raíces son blancas, su diámetro oscila entre 5 - 8 mm, estas se extienden lateralmente cerca de 2.5 a 3 m de la planta y 75 cm de profundidad dependiendo del suelo, aunque la mayoría se concentra en los primeros 15 cm. (Robinson, 2012)

### 3.3.2. Cormo

Un cormo es la base hinchada de un vástago de tallo, envuelto por hojas secas de aspecto escamoso, una estructura sólida, de tallo, con nudo y entre nudo bien definidos. En el ápice del cormo existe una yema vegetativa terminal, en la cual se desarrolla para formar las hojas. (Cervantes, 2013)

### 3.3.3. Tipos de cormo o hijuelos

Según Leonardo M. *et al*, (2012), menciona las recomendaciones de los tipos de hijuelos en el manejo del cultivo de musáceas:

### **a) Hijuelos de espada**

Son aquellos que se identifican por su vigor y desarrollo, tiene la forma de cono invertido, su base es mucho más ancha que la parte superior; sus hojas son delgadas y terminan en punta. Es conveniente dejarlos en la operación de deshije, especialmente los que están separados de la planta madre, ya que ellos indican que inician en la parte baja de la cepa principal y que en el futuro tendrán un buen anclaje.

### **b) Hijuelos de agua**

Se caracteriza por ser débiles, de hojas anchas y el pseudotallo de diámetro angosto y uniforme. No es recomendable el uso de este tipo de plantas, así como la semilla por no producir racimos y frutas de calidad aceptable, por lo que se debe eliminar dentro del cultivo.

### **c) Hijuelos de retoño**

Son aquellos hijos que rebrotan después del deshije, crecen rápido y se confunden con los hijos de agua; por lo cual debe ser eliminados.

#### **3.3.4. Pseudotallo y sistema foliar**

El verdadero pseudotallo está constituido por las vainas envolventes de las hojas, el verdadero tallo aéreo se inicia a partir del cormo y finaliza en la inflorescencia su función consiste en brindar conexión vascular entre hojas y las raíces, así como también los frutos y las hojas. La longitud y grosor del pseudotallo está relacionado directamente con el tipo de clon y con el vigor inherente de la planta que resulta ser el estado de crecimiento, se estima que el pseudotallo de una planta adulta puede llegar a medir hasta 5m y posee 40cm de diámetro aproximadamente, adicionalmente ofrece el apoyo hacia planta y la capacidad de almacenar reservas hídricas. (Herrera, 2011)

Las musáceas presentan tres tipos de hojas: rudimentarias, estrechas ensiformes y hojas anchas o verdaderas. Las hojas verdaderas presentan cinco partes: vaina, peciolo, nervadura central, lámina y el apéndice, son de origen de los meristemas terminales donde desarrollan de modo diferente de acuerdo con la edad de la planta. (Poroma, 2005)

### **3.3.5. Inflorescencia y racimo**

La “inflorescencia” es terminal y crece a través del pseudotallo hasta alcanzar 2 a 3.5 m dependiendo del cultivar, la yema floral es corta y cónico, las células de la yema floral continuarán creciendo longitudinalmente y hacia arriba por la parte central del pseudotallo para emerger por la parte superior de la planta proceso técnicamente conocido como “parición”. Durante el crecimiento dentro del pseudotallo de los brotes florales se diferencian por su desarrollo, al emerger la bellota o inflorescencia, ya están diferenciados los brotes florales con el número de dedos o manos, las flores femeninas y las masculinas quedan expuestas, las femeninas se agrupan en conjunto de dos filas apretadas y sobre expuestas lo que se conoce con el nombre de mano y su distribución está en forma helicoidal a lo largo del eje floral; al conjunto de flores femeninas agrupadas en manos se lo conocen con el nombre de “racimo”. (Choque, 2013)

### **3.3.6. Fruto**

La parte comestible del fruto es el resultado del engrosamiento de las paredes del ovario convertido en una masa parenquimatosa cargada de azúcar y almidón. El desarrollo del fruto es partenocárpico (en las variedades comerciales) es decir, en ausencia de polinización y los frutos resultantes son estériles por consecuencia de la intervención de genes específicos de esterilidad femenina, triploidía y cambios estructurales cromosómicos. De modo que la partenocarpia y la esterilidad son fenómenos diferentes, causados por mecanismos genéticos parcialmente independientes. (Vargas 2012).

### 3.4. Clasificación taxonomía

Según Vargas, (2012) el banano se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera:

**Tabla 1.** Clasificación Taxonómica del Banano.

<b>Reino</b>	<b>Plantae</b>
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Orden</b>	Zingiberales
<b>Familia</b>	Musaceae
<b>Género</b>	Musa
<b>Especie</b>	Musa acuminata

Fuente: Vargas, (2012)

### 3.5. Variedades de banano

#### 3.5.3. Gran Naine (AAA)

La variedad Grand Naine o gran enano es una variedad de porte medio, su pseudotallo tiene un moteado de color pardo, los frutos son de tamaño mediano, curvos y de color amarillo verdoso al madurar, son bananos de cáscara gruesa y sabor menos intenso. Además, es el principal cultivar de banano de exportación en la actualidad. (PRO-ECUADOR, 2016).

#### 3.5.4. Características de la variedad Gran Naine

La planta presenta una altura que oscila entre 1.50 a 2.50 metros, su ciclo vegetativo es de 8.3 a 10.3 meses, su contenido de almidón es bajo, es resistente a las razas 1, 2 y 3 del mal de Panamá, causado por el hongo *Fusarium oxysporum* L. sp. *cubense*; es susceptible a la sigatoka amarilla, al moko, a la sigatoka negra, y a la raza 4 del mal de Panamá. (Sanchez, 2013).

### **3.5.5. Gros Michel, sinonimia local “Guayaquil”**

Pertenece al grupo genómico AAA, subgrupo Gros Michel (sinonimia “Pisan Ambon” en Malasia, “cocos” en México), tiene dos mutantes bien conocidos: Highgate y Cocos. El cultivar Gros Michel produce plantas altas y vigorosas con racimos cilíndricos de gran peso con frutos grandes, de grosor apropiado y de color muy atractivo, por lo que fue durante muchos años el principal cultivar del comercio mundial (Robinson, 2012)

Los mismos autores mencionan, hasta finales de la década de los 1950 cuando las plantaciones de América Central fueron devastadas por la raza 1 de la enfermedad de la marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxisporum cubense* – FOC). A comienzos de los años 1960 estas plantaciones fueron replantadas con cultivares del subgrupo Cavendish “Valery” y “Gran Enana” resistentes a la raza 1, subsistiendo en la actualidad solamente en el norte de Ecuador. (Araya, 2008)

### **3.5.6. Green Red, sinonimia local “Manzano Amarillo”**

Pertenece al grupo genómico AAA, subgrupo Red y Green Red (sinonimias “Morado Verde” en México y Venezuela), no tiene importancia comercial, pero es muy conocido debido a su amplia disseminación mundial. Se trata en realidad de bananos de jardín o de huertas de patio trasero cultivados para el consumo doméstico y poseen un bajo índice de recolección. Green Red (Rojo Verde) frutos de color verde. (Condori, 2017)

### **3.5.7. Red, sinonimia local “Manzano Rojo”**

Pertenecen al grupo genómico AAA, subgrupo Red y Green Red (sinonimias “Morado” en México y Venezuela, “Tafetán” en Colombia, Dacca” en Ingles, “Guineo Morado” en Cuba, “Colorado” en Puerto Rico, “Plátano rojo “en Perú. No tiene importancia comercial. (Pedranzani, 2018)

Mercado, (2006), señala que presentan un pseudotallo alto y robusto que pueden llegar a medir una altura de 5-7 m, de color morado intenso, hojas grandes con un racimo cilíndrico y corto, frutos ligeramente curvos, exocarpio morado, mesocarpio amarillo suave aromática.

### **3.5.8. Sucrier, sinonimia local “Motakusillo”**

Sinonimias “Pisang Mas” en Malasia e Indonesia, “Bocadillo” en Sudamérica, “Dátil” en México, “Titiaro” en Venezuela, “Ciento en Boca” en Cuba. Se trata del cultivar del grupo AA, postre diploide más importante de acuminata. (Robinson, 2012)

Sus frutos son de pequeño tamaño, dulces, de piel delgada y de color amarillento dorado. La planta es resistente al Mal de Panamá y puede soportar vientos, aunque sus racimos son de menor tamaño y su rendimiento es menor que el de otros cultivares triploides, es el cultivar más importante en Malasia. “Pisang Mas” significa plátano oro en lenguaje malayo.

### **3.5.9. Sinonimia local “Sedita”**

Banano del grupo genómico AAA, sinonimia “Guineo” en Colombia, “Criollo”, “Negro” en Venezuela, con un pseudotallo de 320-390 cm de alto (semi gigante), robusto de color verde intenso y muy pigmentado de negro, hojas grandes de 258 cm de largo y 82 cm de ancho, peciolo robustos y cortos. Presenta un racimo corto, manos muy juntas, dedos perpendiculares al eje, compactos, exocarpio muy blando que limita su manejo, al madurar se rajan longitudinalmente y se desprenden del racimo. Resistentes al mal de Panamá y ligeramente al chamusco, pocos daños de nematodos y picudo negro. (Lopez, 2010)

### **3.5.10. Sinonimia local “Isla”**

Sinonimias “Ceda” en Colombia, “Maritú”, “Tornasol”, “Rosa de Oro”, posee un pseudotallo de color rosado y ligeramente pigmentado de negro, bordes del limbo de color rosado. (Choque, 2013)

Racimo pequeño con dedos rectangulares y angulosos, amarillosos desde las primeras etapas de desarrollo, perpendiculares al eje del racimo, con mesocarpio rosado amarillento y pedicelos largos y delgados mencionado (Choque, 2013) (Araya, 2008).

El mismo autor indica: cultivar sin interés comercial, de consumo en fresco o cocinado, pertenecen al grupo genómico AAB, es un cultivar triploide con genomas de *M. acuminata* (A) y *M. balbisiana* (B), con predominio *acuminata*.

### **3.6. Propagación del banano**

La mayoría de las especies comestibles del genero *Musa* son partenocarpías, no producen semillas y para su propagación se separan los hijuelos del corno madre; por lo tanto, la tasa de propagación que se logra a partir de este método, es muy baja, además el riesgo de diseminación de plagas y enfermedades es mayor. (Chipana, 2015)

El banano se caracteriza por la dificultad de reproducirse a través de la vía sexual, por lo que es necesario emplear otras técnicas que permitan su propagación. (Tandazo, 2014)

### **3.7. La Biotecnología en el mejoramiento de los cultivos**

La Biotecnología consiste en la utilización de bacteria, levaduras, células, órganos y tejidos cuyo metabolismo capacidad de biosíntesis están orientados a la formación de clones y fabricación de sustancias específicas. (Cruz, 2012)

La “Biorrevolución” trajo consigo el avance de las ciencias biológicas en las últimas dos décadas, dando lugar al desarrollo de técnicas que posibilitan el estudio de las plantas a escala celular y molecular. Estas nuevas técnicas se conocen como Biotecnologías y se están convirtiendo en herramientas para el mejoramiento de plantas progreso de la agricultura (Roca Y Mroginski, 1991).



Las investigaciones que se realizan en el ámbito de la Biotecnología, tienen varios objetivos: obtener una producción superior de plantas, un valor nutritivo más elevado, una mayor resistencia a la intemperie, a los agentes patógenos, a las plagas y parásitos. De este modo conservan, al mismo tiempo, una diversidad suficiente de las especies domésticas y protegen los recursos genéticos constituidos por sus congénitos silvestres. (Ubilla, 2016)

### **3.8. Biotecnología vegetal**

La biotecnología vegetal permite el empleo de órganos o tejidos vegetales para la obtención de un producto o nuevos genotipos, que comprende desde la micropropagación hasta el cultivo de células y tejidos. (Cruz, 2012)

#### **3.8.1. Cultivo de tejidos *in vitro***

El cultivo *in vitro* es parte fundamental de la Biotecnología, se basa en el principio de la totipotencia, el cual establece que las células son autosuficientes y que en principio tienen la capacidad de regenerar una planta completa. (Tandazo, 2014) El término cultivo de tejidos vegetales involucra diferentes técnicas. Consiste en regenerar plantas a partir de explantes (ápices de raíces o de tallos, primordios de hojas, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones maduros o inmaduros, segmentos de órganos de tallo o de hojas, ovarios, óvulos, anteras y polen) cultivados en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica. (Sharry, 2015)

Con la técnica del cultivo *in vitro* se logra aumentar la cantidad de material vegetal, obteniendo un gran número de plántulas en espacios reducidos, a partir de un solo explante (meristemo), consiguiendo que este material esté libre de enfermedades, y reduciendo los costos de producción. (Tandazo, 2014)

La propagación vegetativa *in vitro* o micro propagación es la aplicación más concreta del cultivo de tejidos y la de mayor impacto (Ibañez, 2013)

### **3.8.2. Micropropagación**

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo *in vitro* es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. INTA (2010), citado por (Ascensio, 2017)

Existen 5 fases de micro propagación *in vitro*: fase 0: selección del material vegetal; fase I: Introducción y Establecimiento; fase II: Multiplicación; fase III: Enraizamiento; fase IV: aclimatación. (Castro, 2016)

#### **A) Fase 0: Selección de la planta madre**

Esta etapa es importante e indispensable para el desarrollo de un esquema de micro propagación eficiente y repetible, por lo que cada vez se va prestando mayor importancia. Tiene una marcada influencia sobre la calidad posterior de las plantas resultantes del proceso tanto desde el punto de vista sanitario, fisiológico como genético (Murillo, 2014).

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre, es decir la planta donadora de yemas, durante un período de tiempo que puede oscilar entre unas semanas o varios meses en un invernadero bajo condiciones controladas. En ese ambiente se cultiva la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición y riego adecuados para permitir un crecimiento vigoroso y libre de enfermedades. (Castillo, A. s./f.)

La planta donante debe elegirse en base a una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explante a establecer en condiciones *in vitro*. En general,

los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos. (Levitus, 2010)

### **B) Fase I: Introducción y Establecimiento**

Para un cultivo aséptico de la especie que se requiere, la fase de introducción y establecimiento incluyendo la desinfección y la siembra del explante en condiciones asépticas en medios de cultivo, esta fase termina con la obtención de un cultivo libre de contaminación visibles y suficientemente adaptadas a las condiciones *in vitro* de modo que pueda presentar una reacción favorable a la aplicación de Fito reguladores en la fase siguiente. (Llanqui, 2011)

Luego de la desinfección superficial, las semillas o las yemas dependiendo del material seleccionado, se ponen en medio de cultivo estéril. En un período de una semana o quince días, comienza el proceso de germinación o regeneración de nuevos tejidos vegetales, iniciando el ciclo de cultivo *in vitro*. (Castillo, A. s.f.)

### **C) Fase II Multiplicación**

En esta fase se realiza la propagación masiva de brotes y la estabilidad genética de los mismos, a partir de los explantes establecidos. El período de formación de yemas laterales para muchos explantes es de 60 días, esperando que al cabo de este tiempo cada sección del brote genere un número mínimo de tres brotes Angarita & Perea, (1991) citado por Quispe, (2010)

Cruz F. (2012) menciona que el objetivo de la multiplicación es de mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación. En este proceso de organogénesis está involucrados una serie de factor tales como los compuestos que forman parte del medio de cultivo, compuestos hormonales y sustancias propias de planta.

### **D) Fase III Enraizamiento**

Se realiza con la finalidad de obtener plantas completas a partir de los brotes, desarrollar su sistema radicular y con ello prepararlas para su restablecimiento a condiciones de suelo (Quispe, 2010)

Levitus, (2010), menciona que los brotes que tengan un tamaño aproximado de 2cm, son separados individualmente y colocados en un medio de enraizamiento, que permite la obtención de plantas completas. Para esta fase se suprime el BAP en el medio de cultivo y no es necesario inducir enraizamiento, ya que la emisión radicular es espontánea, obteniéndose una planta completa en un período de 25 a 30 días.

### **E) Fase IV Aclimatación**

Es la fase donde se logra plantas listas para su trasplante definitivo a campo abierto, las tareas mayores son minimizar las pérdidas (Quispe, 2010).

Sharry S.; *et.al.*, (2015) mencionan que esta etapa es conocida como de endurecimiento, se remueven las plantas del frasco de cultivo y el residuo de gelificante adherido a las raíces se lava con agua corriente; luego, las plantas se siembran en recipientes plásticos o en bolsas de polietileno de color negro, con suelo de adecuada textura, preferiblemente esterilizado. Inicialmente, las plantas requieren de una alta humedad relativa y deben colocarse durante las primeras tres semanas, en un ambiente húmedo y con 75% de sombra.

#### **3.8.3. Tipo de explante**

Un explante apropiado constituye el primer paso para el establecimiento exitoso del cultivo *in vitro*. La planta donante, preferentemente debe estar en condiciones de invernadero, con ello se reduce sustancialmente las tasas de contaminación. Por otra parte, es recomendable evitar el uso de «explantes sucios» (raíces, rizomas) que provienen de plantas crecidas en macetas o en el campo, dado que en la mayoría de

los casos no es posible conseguir una buena desinfección de los mismos. (Ortega, 2011)

Es importante también considerar el tamaño del explante, ya que cuanto más pequeño sea el explante más difícil será encontrar el medio de cultivo adecuado que permita un buen desarrollo, así también indica que en cuanto más grande sea el explante mayor es el riesgo de contaminación. (Murillo, 2014).

La edad fisiológica del explante, es también un aspecto de gran influencia, se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. (Ascensio, 2017).

Sharry, *et al.*, (2015), indica que, conforme la micro propagación, puede ser conducida a través de:

- Yemas apicales.
- Raíces.
- Segmentos de tallos.
- Semillas.
- Embriones cigóticos
- Hojas jóvenes

#### **3.8.4. Vías de regeneración**

La morfogénesis *in vitro* puede seguir dos vías: organogénesis y embriogénesis somática dependiendo principalmente del grado de diferenciación del explante inicial. (Gamarra, 2014)

##### **3.8.4.1. Organogénesis**

Para esta vía de regeneración, se utilizan dos tipos de yemas, laterales, o meristemáticas a las que se denomina explante, estas son estimuladas por cortes en el punto apical de crecimiento o por aplicaciones de citoquininas al medio de cultivo empleado. (Ibañez, 2013)

Aguirre, Pierre, & Leigue, (2016) mencionan, que la organogénesis es un evento morfogenético que se caracteriza por el desarrollo en la formación de un primordio unipolar a partir de una yema con el subsiguiente desarrollo de éste en un brote

vegetativo, existiendo siempre una conexión entre los nuevos brotes y el tejido paterno.

Indica que, en la micropropagación a partir de meristemos es uno de los procedimientos de mayor uso, con el que se obtienen individuos genéticamente idénticos a la planta madre. (Cruz, 2012)

Así también el mismo autor menciona que, los meristemos se pueden clasificar por su origen, posición y la estructura que originan. Los meristemos apicales (o primarios) del tallo y de la raíz conducen al desarrollo del cuerpo primario (raíces, tallos y hojas) de la planta. Los meristemos secundarios como los axilares, son similares a los primarios en estructura y desarrollo, aunque dan origen a raíces y tallos secundarios.

#### **3.8.4.2. Vía embriogénesis somática**

La embriogénesis somática es la formación de embriones por la vía asexual en condiciones *in vitro*. (Lopez, 2010)

Según Rodriguez, (2008), La embriogénesis somática es considerado como el método más eficiente para la producción masiva de plantas *in vitro*, debido a la naturaleza bipolar del embrión, la facilidad con que puede ser automatizado todo el proceso productivo, y por sus altos coeficientes de multiplicación en cortos periodos de tiempo.

La embriogénesis somática, es posible, ya que implícitamente toda célula somática vegetal tiene la capacidad de desarrollarse en un embrión (totipotencia) a partir de la manipulación de condiciones de cultivo y la aplicación de sustancias reguladoras de crecimiento. (Murillo, 2014)

Meza, (2013), indica también que la embriogénesis somática *in vitro* se ha considerado como un avance en las técnicas de micro propagación, aunque todavía presenta problemas en la reconversión ha planta comparada con la organogénesis.

Planteó que al alterar las condiciones de crecimiento y someter los tejidos y órganos inoculados a condiciones no usuales, la planta puede anular o alterar la expresión del gen relacionado a una función específica en la planta. El tipo de explante inicial puede ser un factor fundamental que determina el fracaso o el éxito de un protocolo embriogénico. La embriogénesis somática ha sido la base fundamental de la multiplicación vegetativa y dentro de ella pueden diferenciarse dos vías: Directa e indirecta. (Condori, 2017)

#### **a) Embriogénesis directa**

Este proceso ofrece la posibilidad de obtener embriones somáticos directamente desde el explante utilizado sin la formación de callo. Este desarrollo directo es una fuerte correlación entre el tipo de explante y la concentración de la auxina. Diferentes autores han desarrollado la embriogénesis somática directa, empleando diferentes reguladores del crecimiento a partir de diferentes explantes, cotiledones de semillas, embriones cigóticos, entre otros. (Lopez, 2010)

#### **b) Embriogénesis indirecta**

El proceso de embriogénesis somática indirecta, fue observado por primera vez en suspensiones de zanahoria *Daucus carota* por (Steward, 1958) y a partir de callos creciendo en medio de cultivo semisólido por (Reinert, 1958).

Existen dos tipos de embriogénesis somática indirecta, una conocida como embriogénesis somática de baja frecuencia (ESBF) y otra denominada embriogénesis somática de alta frecuencia (ESAF). En la primera el número de callos con embriones somáticos es mayor, aunque, se forman pocos embriones somáticos por callos. Los mismos aparecen aislados o en pequeños grupos y se desarrollan completamente pasando por las diferentes etapas de desarrollo mientras que en la segunda, los embriones somáticos no se desarrollan completamente, manteniéndose en estado globular, agrupados en un número mucho mayor,

apareciendo en un número menor de callos, lo cual ha sido observado en caoba, papaya, guayaba, bananos y plátano (Gamarra, 2014)

### **3.8.5. Factores que afectan al cultivo *in vitro***

Existen diversos factores que pueden afectar el desarrollo de una planta mediante cultivo de tejidos *in vitro* a partir de cualquier tipo de explante, como ser; el medio de cultivo, el estado fisiológico y tamaño del explante, la manipulación inadecuada del mismo, la procedencia del explante etc. (Ibañez, 2013)

Además, el mismo autor menciona que, la asociación explante-medio y las condiciones físicas en que normalmente se incuban los cultivos conforman un ambiente propicio para la proliferación de microorganismos, los cuales pueden destruir tales cultivos, competir con el explante por el medio de cultivo o modificarlo.

#### **3.8.5.1. Asepsia**

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). (Ibañez, 2013)

Además, para establecer cultivos asépticos es necesario: trabajar en ambientes adecuados; esterilizar los medios de cultivo; desinfectar superficialmente los explantes, para liberarlos de microorganismos exógenos y Manejar adecuadamente las normas de asepsia.

Uno de los principales factores que contribuyen al establecimiento de cultivos asépticos es la desinfección exitosa de la superficie del explante a emplearse, debido a que, si sobre el explante persiste algún microorganismo, ya sea hongo o bacteria, éstos destruirían el cultivo pues compiten con el explante por los nutrientes del medio, siendo ellos más exitosos por sus altas tasas de multiplicación y desarrollo acelerado Roca & Mroginski (1991); citados por Dávila, (2011)



### **3.8.5.2. Oxidación**

Indica que la liberación de fenoles al medio de cultivo, que reaccionan con el oxígeno del frasco, produciendo una coloración rojiza, amarillenta o café. Los compuestos fenólicos actúan como inhibidores del crecimiento emitidos por el propio explante, capaces de causar el envejecimiento y muerte del mismo. Se han documentado incluso diferencias en los grados de oxidación entre los cultivares de una misma especie. (Lopez, 2010)

### **3.8.6. Métodos de desinfección**

Una vez elegida la planta madre, se extraerán los fragmentos a partir de los cuales se obtendrán los explantes. Los explantes pueden ser yemas, trozos de hojas, porciones de raíces, semillas, etc. Antes de extraer los explantes se hará una desinfección de los fragmentos de planta madre para eliminar los contaminantes externos. Los contaminantes más comunes son los hongos y las bacterias que habitan en forma natural en el ambiente. Una vez desinfectado el material vegetal, se debe mantener en condiciones de asepsia. (Castillo, s/f)

A efectos de obtener las condiciones de asepsia, se trabajará en cabinas de flujo laminar para extraer los explantes a partir del material vegetal. Estos explantes se introducirán en un tubo de cultivo conteniendo medio de iniciación para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio (agua clorada comercial), pura o diluída durante un período de 5 a 15 minutos, seguido por 3 a 4 enjuagues en agua esterilizada. (Castillo, s/f)

Desinfección del material vegetal. Se usaron cormos de tamaño de 10 cm de forma cuadrada se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 30% (v/v) durante 12 h, alcohol al 70% por 30 s, hipoclorito de sodio (NaClO) al 5% con dos gotas de tawi 20 por 15 min, AGROBAC 3 g /L durante 5 min (Ortega et al. 2011).

### **3.8.7. Medio de cultivo**

Los medios de cultivo son soluciones acuosas donde se desarrollan células o tejidos vegetales. El desarrollo de éstos solo ocurre en presencia de los nutrientes requeridos de la composición del medio de cultivo garantiza que se le suministren los nutrientes al tejido vegetal in vitro y debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural. (Ancasi, 2016)

El medio de cultivo se compone de sales minerales, sustancias orgánicas como los azúcares (fuentes de carbono), vitaminas (complejo B) y hormonas de crecimiento (auxinas, citocininas, citoquininas, gibelinas, que inducen el crecimiento de la parte aérea o el vástago).

#### **3.8.7.1. Composición del medio de cultivo**

El medio de cultivo más utilizado, se denomina MS dado que fue desarrollado por Murashige y Skoog (1962). Los ingredientes del medio de cultivo se pueden clasificar en: Sales inorgánicas, Compuestos orgánicos, Complejos naturales y Materiales inertes de soporte. (Gamarra, 2014)

##### **➤ Sales inorgánicas**

Los nutrientes inorgánicos utilizados en el cultivo in vitro son los mismos requeridos normalmente por las plantas, unos en mayores concentraciones conocidos como macronutrientes y el otro grupo son los micronutrientes aquellos requeridos en concentraciones más bajas (Lopez, 2010)

Esta división se basa en la cantidad que absorben las plantas ciertos elementos: calcio, magnesio, potasio, nitrógeno, fósforo y azufre son requeridos por la planta en grandes cantidades (g/l) y se les llama macronutrientes. Otros como el hierro, manganeso, boro, cobre, zinc, molibdeno y cloro, se requieren en pequeñas cantidades en pequeñas cantidades (mg/l o ppm) y se llaman elementos traza o micronutriente. (Ascensio, 2017)

- **Compuestos orgánicos**

Se clasifica en tres grupos: carbohidratos, sustancias hormonales y vitaminas. Frecuentemente se han obtenido buenos resultados cuando se emplean también ciertos aminoácidos y/o amidas, algunas purinas, pirimidinas, hexitoles y ácidos orgánicos. (Ascensio, 2017)

- **Fuente de carbono**

La sacarosa es la fuente de carbono más ampliamente utilizada y se emplea a una concentración de 2-4 por ciento. Ocasionalmente se utilizan otros carbohidratos como la glucosa en cultivos de monocotiledóneas, así como la fructosa, almidón, lactosa, maltosa, sorbitol, manitol y galactosa en otras especies; pero esos compuestos son inferiores a la sacarosa como fuente de carbono. La sacarosa puede ser sustituida por azúcar refinada que también genera óptimos resultados. (Murillo, 2014)

- **Reguladores de crecimiento**

Los reguladores de crecimiento son un conjunto de sustancias químicas y orgánicas distinto de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican de algún modo cualquier proceso fisiológico en las plantas. (Ascensio, 2017)

Así mismo indican que, actualmente los reguladores de crecimiento están bien agrupadas y divididas en: promotores de crecimiento (auxinas, citoquininas y giberelinas), inhibidores de Crecimiento (ácido abcísico) y etileno.

- **Promotores de crecimiento**

Dentro de este grupo se encuentran las auxinas, citoquininas, y giberelinas, estas hormonas de crecimiento interactúan un papel importante en el desarrollo de las vitroplantas.

**Tabla 2.** Promotores de crecimiento o Fito reguladores de plantas.

<b>AUXINAS</b>	<b>CITOQUININAS</b>
Ácido indolacético (AIA)	6-Bencilaminopurina (6-BAP)
Ácido indolbutírico (IBA)	Dimetilalil aminopurina (2Ip)
Ácido Giberélico (AG <sub>3</sub> )	Furfuril aminopurina (Kinetina)
	Adenina (Zeatina)

La combinación adecuada de auxinas y citoquininas es un factor importante a considerar para el desarrollo de las vitroplantas, ya que las auxinas promueven un desarrollo vertical de la planta, por otro lado, las citoquininas incrementan la división celular esto origina la formación de los próximos órganos de la planta. (Ascensio, 2017)

- **Vitaminas y aminoácidos**

Los aminoácidos y amidas son empleados en los medios de cultivo como fuentes de nitrógeno orgánico, pero muchas veces no es necesario porque el medio de cultivo contiene otros elementos de Nitrógeno, resulta beneficiosa su inclusión para favorecer el desarrollo de las vitroplantas (Ortega, 2011)

- **Material inerte de soporte**

El agar es el material de soporte más ampliamente utilizado, pues provee al medio de un excelente gel húmedo que sirve como soporte al inóculo, se derrite al calentarlo y se enfría a temperatura ambiente. (Murillo, 2014)

### 3.8.1. Cultivo de tejidos *in vitro* en banano

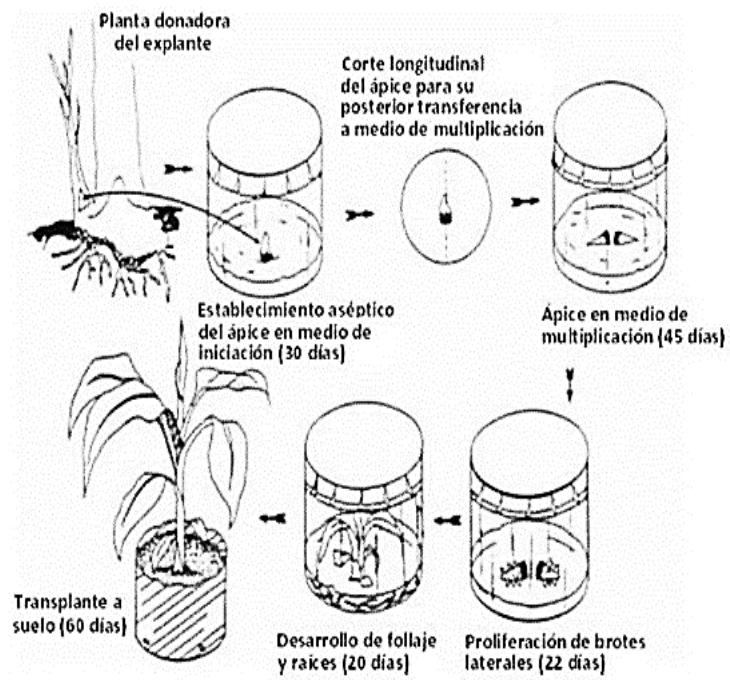
La técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, permite la propagación masiva de muchas especies vegetales, entre ellas plantas musáceas libres de enfermedades, que permiten se realicen selecciones clónales de genotipos sobresalientes, sus características agronómicas, organolépticas y de adaptación a ambientes específicos, resistentes a estrés biótico y abiótico; además, de que puede ocurrir durante todo el año por ser realizado en condiciones controladas de laboratorio. (Pedranzani, 2018)

Mendez, (2014), indica que postuló el principio de la totipotencia que es la base teórica sobre la que se sustentan todas las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro*". Al respecto Hartmann (1994), indica que el cultivo de tejidos vegetales está enfocado especialmente a la obtención de plantas libres de patógenos y enfermedades y la propagación masiva de algunas especies de interés económico y biológico.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* puede entenderse como el conjunto de técnicas y procedimientos que permiten el cultivo en células, tejidos y órganos empleando medios nutritivos artificiales con el objetivo de regenerar una planta. (Mendez, 2014)

Se define el cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas que permiten el desarrollo de cultivos de órganos, tejidos, células y protoplasmas en condiciones asépticas empleando medios nutritivos artificiales. (Pedranzani, 2018)

En la Figura 2, se describe el procedimiento paso a paso del cultivo de ápices vegetativos en *musa sp.* Con el uso de técnicas *in vitro*.



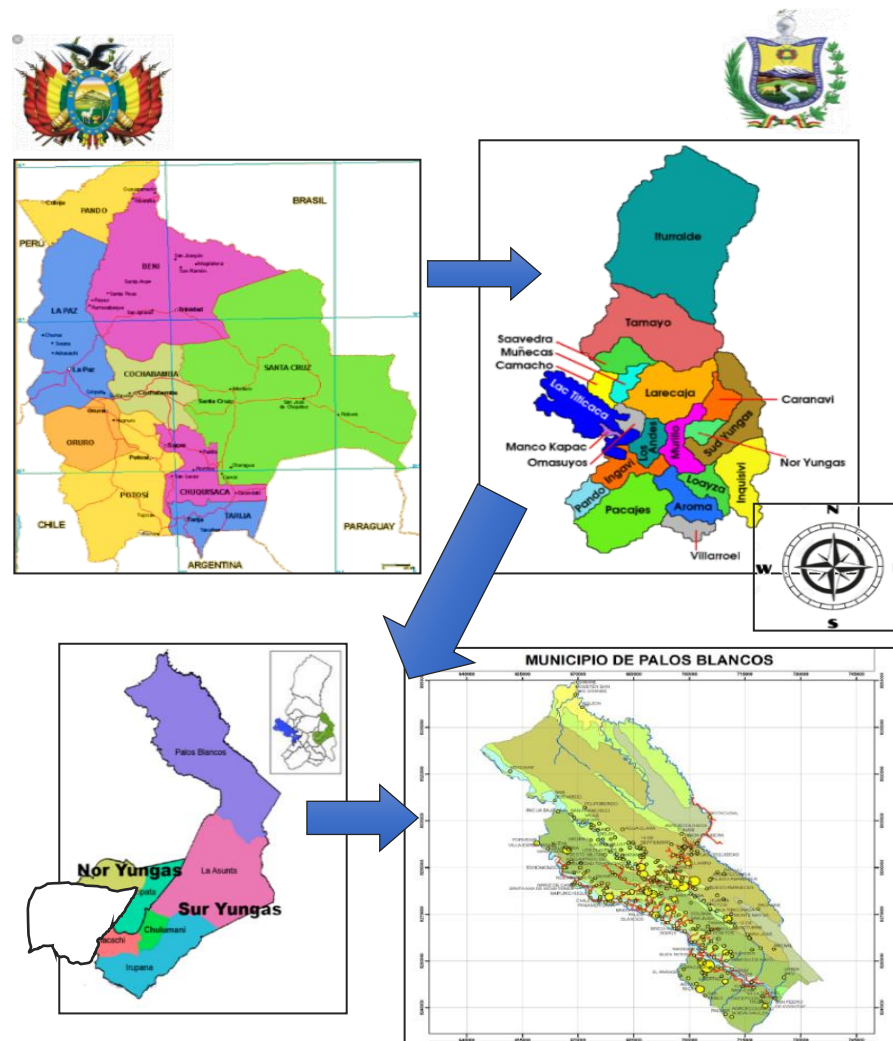
**Figura 2.** Proceso para el cultivo de ápices en *mussa sp.*

Fuente: QUISPE, (2010).

## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1. Localización

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología vegetal de la Estación Experimental de Sapecho, perteneciente a la Facultad de Agronomía Universidad Mayor de San Andrés que se ubica al norte del departamento de La Paz en la región de Alto Beni Sud Yungas cuarta sección del municipio de Palos Blancos.

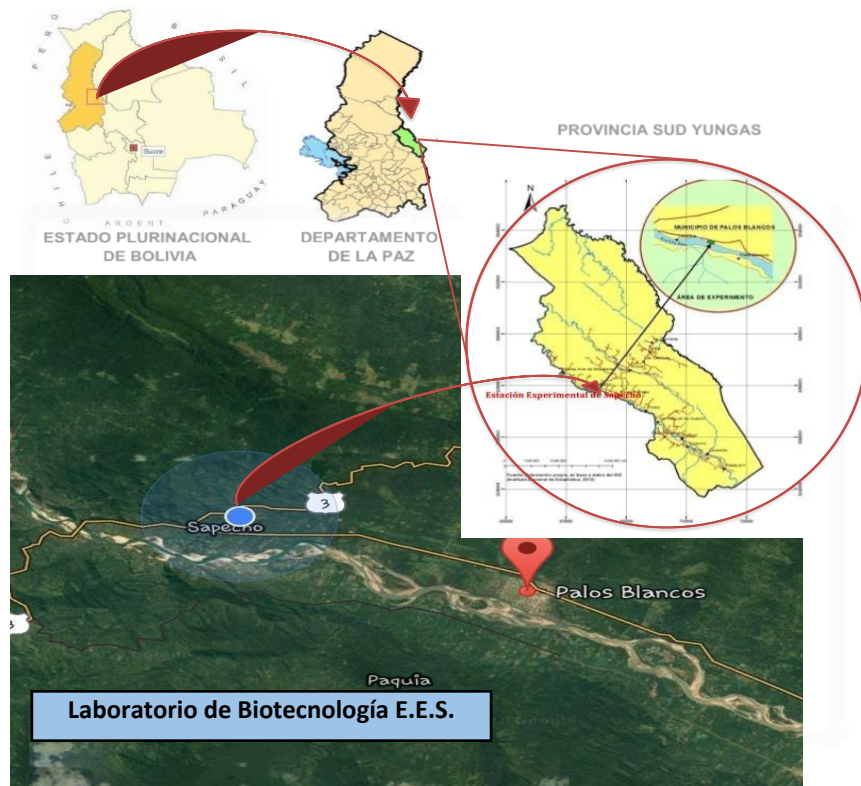


**Figura 3.** Ubicación del municipio de Palos Blancos.

Fuente: Plan de Desarrollo Municipal, 2014.

#### 4.1.1. Ubicación geográfica

La Estación Experimental se encuentra en el área 2 de la región de Alto Beni de la provincia Sud Yungas localidad de Sapecho a 15°33' Latitud Sur y 67° 20' Longitud Oeste, a 270 km del departamento de La Paz, a una altitud de 400 msnm (SENAMI, 2018).



**Figura 4.** Ubicación Estación Experimental Sapecho.

Fuente: Publicación PEI. E.E.S. U.M.S.A, 2014 – 2019

#### 4.1.2. Laboratorio de Biotecnología Vegetal Estación Experimental Sapecho - UMSA

El Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la de la Estación Experimental de Sapecho dependiente de la Facultad de agronomía UMSA, se encuentra organizada de forma básica, y comprende de aéreas específicas:



#### **a) Área de lavado**

Cuenta con mesones, lavaderos, material de limpieza (detergentes, esponjas, cepillos, etc.), es destinada a la limpieza del material vegetal, material de vidrio (Frascos, vasos, tubos de ensayo, pipetas, etc.), y otros instrumentales necesarios. Cuenta también con un destilador de agua.

#### **b) Área de preparación de Medios de Cultivo**

Destinado específicamente para la preparación de medios de cultivo, cuenta con un refrigerador para el almacenamiento de reactivos químicos, un estante para almacenar material de vidrio y mesones para la preparación de medios.

#### **c) Área de esterilización**

El área de esterilización tiene un mesón, y una autoclave vertical.

#### **d) Área de micropropagación**

Es un área aislada de los ambientes donde se realiza la micropropagación y transferencia de explantes a condiciones *in vitro*; en la cámara de flujo laminar, esterilizador de pinzas, mecheros y un alto nivel aséptico.

#### **e) Área de crecimiento**

Los cultivos establecidos *in vitro* se incuban en un área aislada del resto con altos niveles asépticos, y control de la temperatura promedio de 27°C y humedad relativa 60% y fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuras. Consta de una cámara de germinación, estantes con focos blancos.

### **4.2. Materiales**

#### **4.2.1. Material genético**

El material genético utilizado para la investigación fueron yemas apicales obtenidas de 108 hijuelos y/o cormos de banano variedad Gran Naine o banano gigante, obtenidas de una parcela experimental ubicada en los predios de la Estación

Experimental de Sapecho. Esta variedad fue seleccionada por sus buenas características fenotípicas, y de gran aceptación en el mercado.



**Figura 5.** Hijuelos de banano Gran Naine (A) Parcela experimental (B).

#### 4.2.2. Material de Laboratorio

Los materiales de laboratorio esenciales utilizados en la investigación se detallan en el Tabla 3:

**Tabla 3.** Materiales de laboratorio.

MATERIAL DE VIDRIO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetas graduadas (5,10, ml)</li> <li>• Probetas (100, 250, 500, ml)</li> <li>• Matraz de Erlenmeyer (250, 500, ml)</li> <li>• Vasos pequeños (6 cm de longitud y 4 cm de diámetro).</li> <li>• Tubos de ensayo (tamaño mediano).</li> <li>• Frascos gerberts, placas Petri, vaso de precipitación (100, 250, 500,1000 ml).</li> </ul>
MATERIAL DE DISECCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hojas de bisturí (N° 11, y 23),</li> <li>• Mangos para bisturí (N° 11, y 23)</li> <li>• Pinzas largas y medianas,</li> <li>• Cuchillos,</li> </ul>
MATERIAL DE MEDICIÓN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vernier digital, reglas metálicas,</li> <li>• Planillas de evaluación.</li> </ul>
MATERIAL DE BIOSEGURIDAD	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Guardapolvo, barbijo, gorro, zapatos exclusivos, guantes de látex desechables.</li> </ul>
MATERIAL COMPLEMENTARIO	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mechero de alcohol, bandeja de metal, papel aluminio, papel madera, papel toalla, marcadores, ligas elásticas, atomizador, plastifilm.</li> </ul>



**Figura 6.** Materiales del Laboratorio.

### 4.2.3. Equipos de laboratorio

Dentro de los equipos de laboratorio podemos mencionar: Autoclave (vapor bajo presión), balanzas (analítica y precisión), cámara de flujo laminar de aire, horno microondas, pH-metro, agitador magnético, refrigerador, termómetros de máximas y mínimas, destilador de agua, además de una sala de crecimiento.



**Figura 7.** Equipos de laboratorio.

### 4.3. Metodología

#### 4.3.1. Preparación de medios

Dentro de la investigación se realizó la preparación de una solución madre (solución Stock) y dos medios de cultivo.

##### 4.3.1.1. Preparación de la solución Stock

Se preparó las soluciones madres Stock, Las mismas están compuestas por cinco soluciones stock: A, B, C, D y E. Estas soluciones concentradas contienen, micronutrientes, macronutrientes, vitaminas y aminoácidos, en base a sales inorgánicas formuladas por Murashige y Skoog (1962) (Anexo 1).



**Figura 8.** Preparación de la solución Stock

Una vez preparada la solución madre, se procedió con la preparación de la solución stock de los reguladores de crecimiento Bencilaminopurina (BAP) 2,7 mg/L, Acido Indolacetico (AIA) 0,3 mg/L, Acido Giberelico (AG<sub>3</sub>) 2 mg/L, Acido Naftalenacetico (ANA) 0,5 mg/L, e Acido indol-3-butirico (IBA) 0,5 mg/L. (Anexo 2)

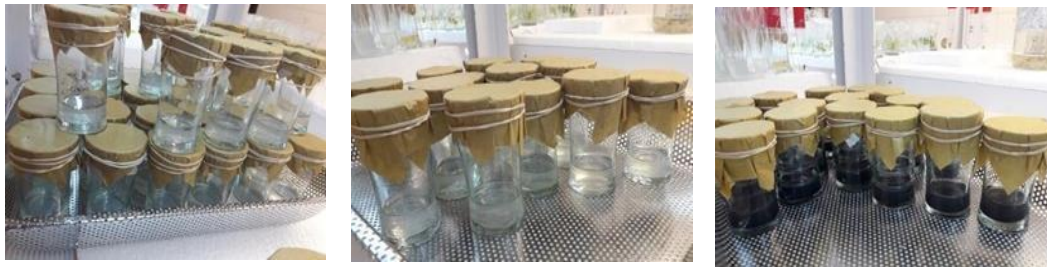
Una vez realizada la preparación de las soluciones madres, estas fueron llevadas a refrigeración durante 24 horas antes de ser utilizados.

##### 4.3.1.2. Preparación del medio de cultivo de introducción y establecimiento

Para la preparación del medio de cultivo se trabajó con el 100% de la concentración del medio basal o solución Stock, se preparó tres medios de cultivo propuesto por

diferentes autores CATIE (2016), Colmenares y Giménez, (2001), y Medina M., *et al.* (2015). (Anexo 3).

Una vez preparado los medios de cultivo estas fueron distribuidos en vasos pequeños con una capacidad en volumen de 85ml (4cm de diámetro y 7cm de altura), a razón de 10 ml de medio de cultivo por vaso estas fueron selladas con parafil y papel aluminio para posteriormente ser esterilizados en la autoclave en un tiempo de 15 minutos a 121°C y 15 PSI de presión.



**Figura 9:** Medio de cultivo I, medio de cultivo II, medio de cultivo III.

#### **4.3.2. Introducción y establecimiento a condiciones *in vitro***

##### **4.3.2.1. Selección del material vegetal**

Se seleccionó como material vegetal hijuelos de espada con una altura entre 30 a 40 cm, con buenas características fenotípicas, y fitosanitarias, se seleccionó 12 cormos por tratamiento posteriormente estos fueron llevados a laboratorio para su posterior desinfección. Es necesario mencionar que se tomó los hijuelos de plantas madres aproximadamente 2 años en producción.



**Figura 10.** Material vegetal (hijuelos de banano).



#### 4.3.2.2. Desinfección del material vegetal

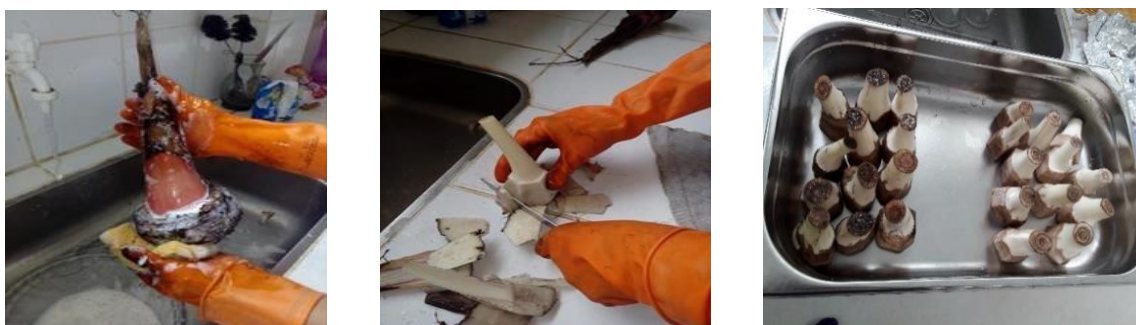
Los hijuelos de banano seleccionadas fueron trasladadas a laboratorio en donde se les realizo la separación con un corte de partículas de tierra y las raíces por debajo del ápice posteriormente se sometieron a dos desinfecciones con diferentes sustancias.



**Figura 11.** Desinfección del material vegetal.

##### ➤ Limpieza de hijuelos

Los hijuelos de banano seleccionados fueron lavados con detergente y agua corriente por 5 minutos esto para eliminar la tierra, posteriormente se lavaron con detergente común (Figura 12). Este proceso se realizó de manera preventiva para todos los tratamientos.



**Figura 12.** Desinfección preventiva de cormos (Agua corriente y detergente).

➤ **Primera desinfección**

Los meristemas fueron lavados con agua corriente por 3 minutos y enjuagados con agua destilada, posterior a ellos fueron sometieron a una desinfección de alcohol e hipoclorito de sodio, este proceso se realizó fuera de la cámara de flujo laminar FDCFL (Tabla 4).



**Figura 13.** Primera desinfección en soluciones desinfectantes.

**Tabla 4.** Primera Desinfección de los meristemas apicales.

Soluciones	I (E.E.S., 2018)		II (UBILLA, 2016)		III (MEDINA, 2014)	
	Concentración (%)	Tiempo (Min)	Concentración (%)	Tiempo (Min)	Concentración (%)	Tiempo (Min)
Detergente líquido	-	-	2	10	-	-
Hipoclorito de sodio	5,5	15	0,5	15	5,5	10

➤ **Segunda Desinfección**

Dentro de la cámara de flujo laminar DCFL, se realiza la segunda desinfección exponiendo en alcohol e hipoclorito de sodio con un porcentaje de concentración y determinado tiempo, pasando por un desenfugue de 3 veces en agua estéril descritos en la siguiente tabla 5.



**Figura 14.** Segunda desinfección en soluciones desinfectantes.

**Tabla 5.** Segunda Desinfección

SOLUCIONES	I (E.E.S., 2018)		II (UBILLA, 2016)		III (MEDINA, <i>et. al.</i> , 2014)	
	Tiempo Concentración (%)	(Min)	Tiempo Concentración (%)	(Min)	Tiempo Concentración (%)	(Min)
Alcohol	70	10	70	15	-	-
Hipoclorito de sodio	2	2	-	-	3	20
Ácido Cítrico	200mg/L	8 a 10 s	-	-	-	(8 días Oscuridad.)

Se emplearon tres métodos de desinfección propuesto por diferentes autores como ser: EES, (2018), Ubilla., (2016) y Medina., *et al.* (2015) a los que denominaremos método de desinfección I, II, y III, estos métodos son descritos en el (anexo 4).

#### 4.3.2.3. Cultivo de ápices meristemáticos

Hecha la desinfección de los explantes dentro de la cámara de flujo laminar, se procedió a la disección de los mismos, con la ayuda de un bisturí totalmente estéril se realizó los cortes longitudinales y transversales reduciendo el tamaño del explante hasta 2 cm por 2 cm aproximadamente.



**Figura 15.** Cultivo de ápices meristemáticos.



Finalmente, los ápices (explante) de banano se cultivaron en el medio de cultivo solido de introducción o iniciación de Murashige y Skoog (1962), estas fueron selladas con PVC plástico transparente o parafilm, marcando las muestras exponiendo en la parte superior la variedad, fecha de introducción y numero de muestra.

Hecha la introducción del material vegetal las muestras fueron llevadas a la sala de crecimiento donde se les sometió a las siguientes condiciones: ambiente con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuras, temperatura 27°C, con una humedad relativa de 66% por un periodo de 30 días.

#### **4.3.2.4. Establecimiento de explantes**

Pasando los 20 días de haber introducido los explantes a condiciones *in vitro*, se llegó a evaluar el porcentaje de establecimiento mediante las evoluciones de contaminación y sobrevivencia por tratamientos durante la etapa de introducción de explantes.

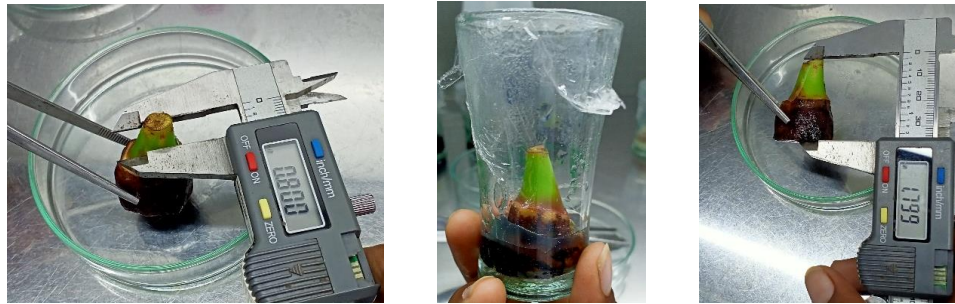


**Figura 16.** Establecimiento de meristemos apicales.

#### **4.3.2.5. Desarrollo de la vitroplanta**

Pasado los 30 días de establecimiento de las vitroplantas, estos tomaron un color verde -blanco-amarillo, y se observó un aumento de tamaño en la base. Se realizó una nueva disección de forma vertical hiriendo la dominancia apical de los explantes seleccionados, sumergiéndolas en una solución de antibióticos, con el fin de evitar la contaminación del explante seleccionado.

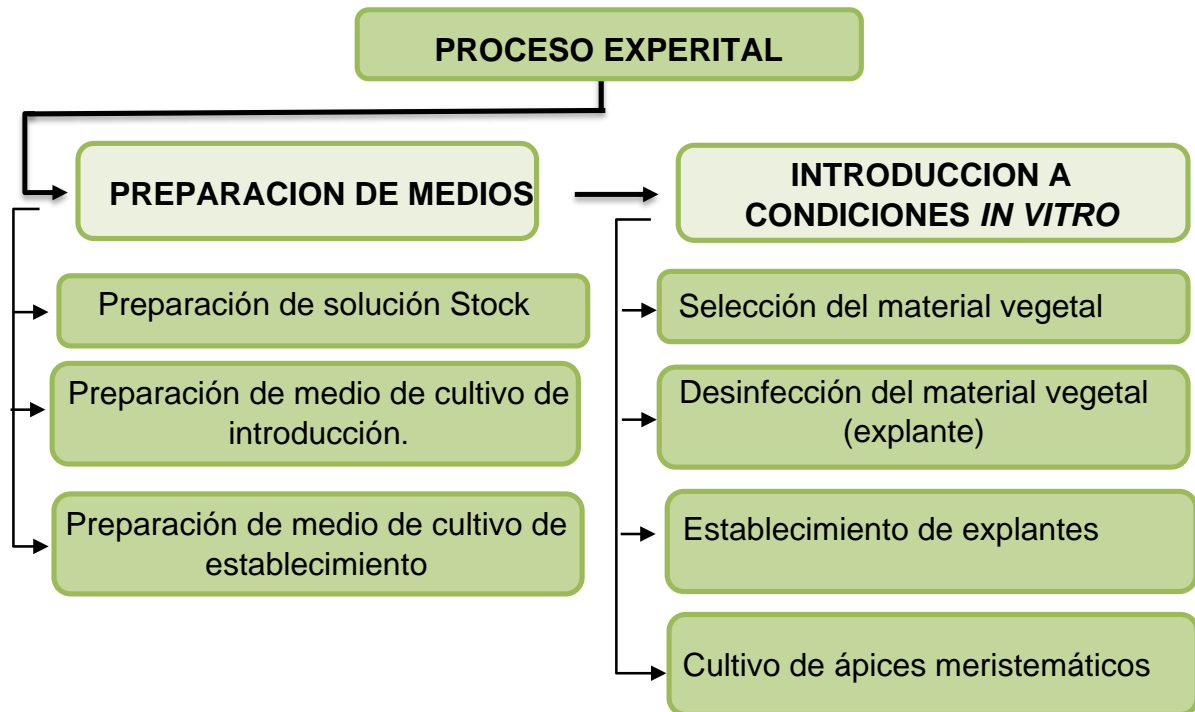
Estos fueron trasferidos a diferentes medios de cultivo (subcultivo) en donde se evaluó la concentración de Citoquinina (BAP) y auxinas (AIA).



**Figura 17.** Subcultivo de yemas meristemáticas.

Una vez realizado el subcultivo estos fueron transferidos a la sala de crecimiento, donde fueron separados por tratamiento, sometiéndose a las siguientes condiciones: ambiente con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuras, temperatura 27°C, y humedad relativa de 66%. Por un periodo de 60 días.

La metodología se realizó en base al siguiente flujograma:



**Figura 18.** Proceso experimental.

Se presenta un flujograma en base a la metodología utilizada en la investigación denominado proceso experimental, en el que se diferencian 2 actividades esenciales. Para llevar a cabo dicha actividad se procede a desarrollar diferentes procesos que serán descritos en los siguientes capítulos.

### 4.3.3. Diseño experimental

Para el análisis estadístico se utilizó el Diseño Completamente a Azar (D.C.A.) con arreglo Bi factorial (tres métodos de desinfección y tres medios de cultivo) con tres repeticiones por tratamiento y 4 unidades experimentales por repetición. Se aplicó la prueba de Tukey al 5% de probabilidad (Rojas, s.f.)

- **Modelo lineal aditivo**

El modelo aditivo corresponde al siguiente:

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

**Dónde:**

$X_{ijk}$  = Observación cualquiera

$\mu$  = Media general

$\alpha_i$  = Efecto i-ésimo método de desinfección

$\beta_j$  = Efecto de j-ésimo medio de cultivo

$(\alpha\beta)_{ij}$  = Interacción del i-ésimo método de desinfección y j-ésimo medio de cultivo

$\epsilon_{ijk}$  = Error experimental

- **Factores de estudio**

**Tabla 6.** Factores de estudio.

<b>Factor A (Métodos de desinfección)</b>	<b>Factor B (Medios de cultivo)</b>
$a_1$ = Método I	$b_1$ = Medio de cultivo 1
$a_2$ = Método II	$b_2$ = Medio de cultivo 2
$a_3$ = Método III	$b_3$ = Medio de cultivo 3

En el cuadro se observa los factores de estudio los cuales son: tres métodos de desinfección que corresponde al factor A y tres medios de cultivo representada por el factor B.

- **Combinación de factores**

**Tabla 7. Descripción de los tratamientos**

Tratamientos combinados		
Tratamiento	Combinación	Descripción
Métodos de desinfección x medio de cultivo		
<b><math>T_1</math></b>	<b><math>a_1 b_1</math></b>	Método I x medio de cultivo 1
<b><math>T_2</math></b>	<b><math>a_2 b_1</math></b>	Método II x medio de cultivo 1
<b><math>T_3</math></b>	<b><math>a_3 b_1</math></b>	Método III x medio de cultivo 1
<b><math>T_4</math></b>	<b><math>a_1 b_2</math></b>	Método I x medio de cultivo 2
<b><math>T_5</math></b>	<b><math>a_2 b_2</math></b>	Método II x medio de cultivo 2
<b><math>T_6</math></b>	<b><math>a_3 b_2</math></b>	Método III x medio de cultivo 2
<b><math>T_7</math></b>	<b><math>a_1 b_3</math></b>	Método I x medio de cultivo 3
<b><math>T_8</math></b>	<b><math>a_2 b_3</math></b>	Método II x medio de cultivo 3
<b><math>T_9</math></b>	<b><math>a_3 b_3</math></b>	Método III x medio de cultivo 3

De acuerdo a las combinaciones de los factores, el ensayo presenta nueve tratamientos, se consideró tres repeticiones por cada tratamiento.

#### **4.3.3.1. Variables de respuesta**

Para cuantificar el comportamiento de los tratamientos (Tabla 7) se realizó evaluaciones en periodos de siete días, durante 8 semanas, este proceso se realizó para la fase de introducción y establecimiento.

##### **a) Porcentaje de contaminación**

A los siete días se realizó la primera evaluación para el porcentaje de contaminación, en donde se identificó el número total de vitroplantas contaminadas por cada

tratamiento (presencia de hongos y /o bacterias), que posteriormente fueron eliminadas, este proceso se llevó a cabo en intermedios de 7 días en un periodo de 30 días.

Para llegar a los resultados se utilizó la siguiente relación:

$$PC(\%) = \frac{NVC}{TV} \times 100$$

**Donde:**

PC = Porcentaje de contaminación (%).

NVC = Numero de vitroplantas contaminadas.

TV = Total de vitroplantas.

#### **b) Porcentaje de oxidación**

Se realizó el conteo visual de los explantes que no presentaron oxidación (plantas necrosadas), el fenómeno se da por la presencia de sustancias fenólicas internas de la planta seleccionada, se identificó el número total de vitroplantas oxidadas a los 30 días. Para llegar a los resultados se utilizó la siguiente relación:

$$PO(\%) = \frac{NVO}{TV} \times 100$$

Donde:

PO = Porcentaje de oxidación (%)

NVO = Numero de vitroplantas oxidadas

TV = Total de vitroplantas.

### **c) Porcentaje de sobrevivencia**

Expresa el número de explantes que lograron desarrollarse favorablemente en porcentajes, donde se cuantificó el número de individuos muertos (Explantes con necrosis sin respuesta) y se diferenció con el número de individuos establecidos. Para llegar a los resultados se utilizó la siguiente relación:

$$PS(\%) = \frac{NVE}{TV} \times 100$$

**Donde:**

PS = Porcentaje de sobrevivencia (%).

NVE = Numero de vitroplantas establecidas

TV = Total de vitroplantas.

### **d) Desarrollo vegetativo**

Expresa el desarrollo longitudinal (altura) alcanzado y es medido en centímetros (cm), datos tomados desde la base de la planta que sobresale del medio de cultivo hasta el ápice de la vitroplantas, los datos se tomaron desde la introducción del explante hasta el desarrollo de la vitroplanta.

También se midió el diámetro medio (mm) de los explantes con la ayuda de un vernier digital

#### **4.3.4. Transformación de datos**

Se realizó la transformación de datos debido a la heterogeneidad de las mismas, para la cual se utilizó  $\sqrt{x+1}$ . Para el procesamiento de datos se empleó el programa, InfoStat V.11, y para los análisis muestrales, se empleó la prueba de rango múltiple de tukey al nivel de confianza del 95% (Reyes, 1999)

#### **4.3.5. Análisis de costos parciales**

El análisis de costos parciales se realizó en base a los costos de insumos y materiales por método de desinfección y las preparaciones de medios de cultivo, esto con el fin de reflejar los costos de introducción y establecimiento que se podrían llegar a conseguir para esta fase.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Con el análisis de los datos obtenidos en la investigación se llegaron a los siguientes resultados y discusiones:

### 5.1. Fase de introducción del material vegetal a condiciones *in vitro*.

Para esta fase se tomaron encuentra las siguientes variables:

#### 5.1.1. Porcentaje de contaminación

En el proceso de investigación se observó que la contaminación fue ocurrida por tres causantes; hongos, bacterias y oxidación.

##### 5.1.1.1. Contaminación por hongos

Los resultados que se presentan el análisis de varianza (Tabla 8) para el porcentaje de contaminación por hongo muestra diferencia significativa entre los métodos de desinfección (Factor A). En cambio, no existe diferencias significativas entre medios de cultivos (Factor B) y la interacción de las mismas (Factor A \* Factor B).

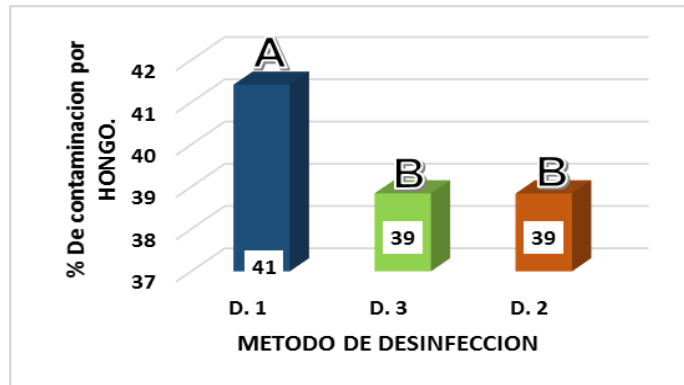
**Tabla 8.** Análisis de varianza del porcentaje de contaminación por hongos.

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	GL	CM	F tab	F cal	Sig.
Método de desinfección (A)	0,06	2	0,03	4,5	0,026	*
Medios de cultivo (B)	0,02	2	0,01	1,5	0,2497	NS
Factor A *Factor B	0,04	4	0,01	1,5	0,244	NS
Error	0,13	18	0,01			
Total	0,25	26				

C.V.= 5,29%

De acuerdo al análisis de varianza de la tabla 8, indica que existe diferencias significativas entre los tratamientos del factor A (métodos de desinfección), mientras que en el Factor B (medios de cultivo) y la interacción (Factor A\*Factor B), no existen diferencias significativas, así mismo se encontró un coeficiente de variación (CV) de 5,29%, los mismos que se encuentra dentro del rango de aceptación para experimentos de cultivos *in vitro*.





**Figura 19.** Comparación de medias del Factor A para el porcentaje de contaminación por Hongo.

Para el factor (A) que corresponde a los métodos de desinfección se realizó el análisis de medias mediante Tukey (5%). La figura 19, nos permite observar que los métodos de desinfección II y III, presentan una menor contaminación igual a 39%, a diferencia el método de desinfección I, basado en la metodología del E.E.S. (2018) obtuvo mayor contaminación con 41 %.

Al respecto Araya, E. (2000), citado por Ancasi *et al.*, (2016) mencionan que a mayor concentración y tiempo de exposición de los explantes al NaOCl, se obtiene un menor porcentaje de contaminación.

### 5.1.1.2. Contaminación por bacteria

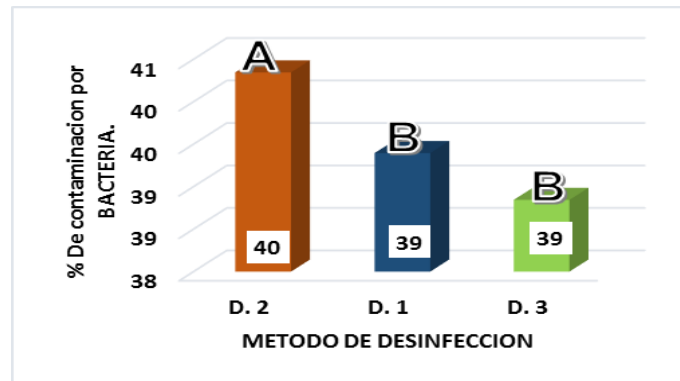
**Tabla 9.** Análisis de varianza del porcentaje de contaminación por bacteria.

FUENTE DE VARIACIÓN	SC	GL	CM	F tab	F cal	Sig.
Método de desinfección (A)	0,017	2	0,008	3,468	0,0532	NS
Medios de cultivo (B)	0,01	2	0,005	2,128	0,1481	NS
Factor A *Factor B	0,008	4	0,002	0,884	0,4933	NS
Error	0,043	18	0,002			
Total	0,078	26				

CV: 3.09 %

Según el análisis de varianza para la contaminación por bacteria, no se encontró diferencias significativas para el factor A y el factor B y la interacción entre ambos factores, obteniendo un coeficiente de variación (CV) de 3,09%, lo cual indica que los

datos obtenidos en la investigación fueron llevados correctamente los mismos que se encuentra dentro del rango de aceptación para experimentos de cultivos *in vitro*.



**Figura 20:** Comparación de medias de contaminación por Bacteria en los Método de desinfección.

Nos muestra que una vez realizado la comparación de medias entre los tratamientos según el rango múltiple de comparación de medias de Tukey, el método desinfección III; propuesto por Medina *et al.*, (2015), existe menor contaminación, de vitroplantas con 39%, y en el método de desinfección II propuesto por Colmenares y Gimenez, (2001) fue el que presento mayor contaminación por bacteria con 40%.

Según Sandoval, *et. al.* (1991), indica que este tipo de síntomas es característico en explantes de musáceas causadas por contaminación bacteriana en la fase de establecimiento aséptico, debido a que el material vegetal de campo proviene de áreas que presentan mal drenaje. Los explantes contaminados con bacterias, posteriormente tuvieron necrosamiento de los tejidos; en vista de que el control de esta contaminación fue difícil y la menor incidencia de casos, recomiendan eliminar dichos cultivos (Sandoval, *et. al.*, 1991).

Según Van den Houwe *et al.* (2004), quienes al aplicar un protocolo de desinfección basado en etanol al 70 % e hipoclorito de sodio al 2 %, obtuvieron 20 y 30 % de contaminación bacteriana en los ápices de 5 mm y 50 % en los de 10 mm en cultivares de banano “Gran Enano” y “Pisang Palembang”, respectivaente.

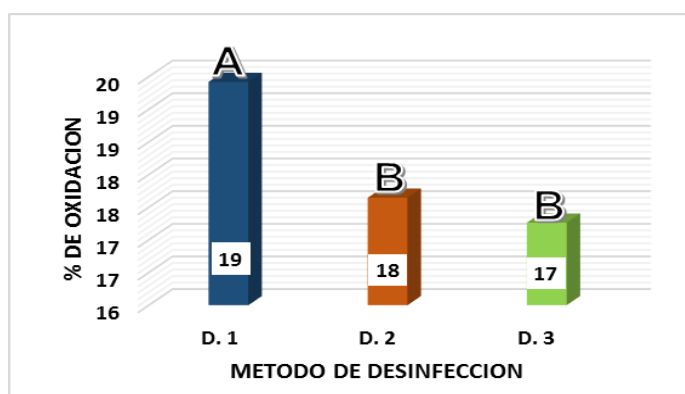
### 5.1.1.3. Porcentaje de oxidación fenológica

**Tabla 10.** Análisis de varianza del porcentaje de oxidación fenológica.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F Tab	F cal	Sig.
Método de desinfección (A)	0,1927	2	0,0964	10,75	10,7536	**
Medios de cultivo (B)	0,0781	2	0,0391	4,359	4,3595	*
Factor A *Factor B	0,1282	4	0,032	3,575	3,5758	*
Error	0,1613	18	0,009			
Total	0,5604	26				

CV: 5,81 %

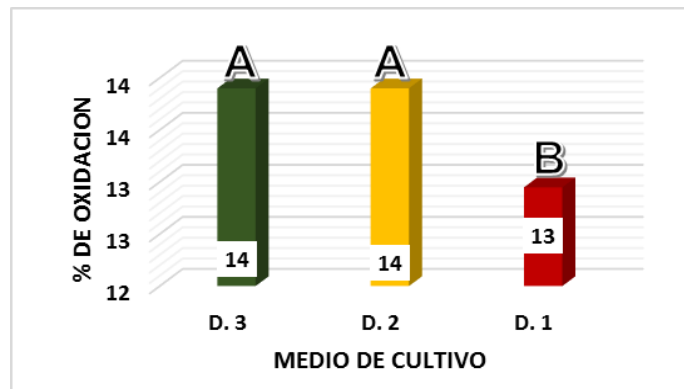
De acuerdo al análisis de varianza para el porcentaje de oxidación, en el Tabla 10, se puede evidenciar que en el factor A, las diferencias son altamente significativas, mientras que para el factor B y la interacción entre ambos factores se obtuvo un resultado significativo al 0.05%, con un coeficiente de variación de 5,81%, lo cual indica que los datos obtenidos en la investigación fueron llevados correctamente, los mismos que se encuentra dentro del rango de aceptación para experimentos de cultivos *in vitro*. Para un mejor análisis se realizó las medias correspondientes por el método de Tukey a nivel de significancia del 5%, donde se encontró que existen diferencias estadísticas entre los tratamientos.



**Figura 21.** Comparación de medias para el porcentaje de oxidación fenológica en los Método de desinfección.

Se puede observar que el método de desinfección que presento una menor contaminación por oxidación en el método III, (Medina MA. 2015) con un (17%), y

obteniendo con mayor presencia de oxidación fue el método de desinfección I, (basado en la metodología de la E.E.ES. 2018), con (19%).



**Figura 22.** Comparación de medias para el porcentaje de oxidación fenológica en los Medios de cultivo

Se puede observar que el medio de cultivo que presentó una menor contaminación por oxidación en el método I, (basado en la metodología del CATIE, 2016), con (13%) y obteniendo con mayor presencia de oxidación fue el método de desinfección III, (Medina MA. 2015) con un (14%).

Según Sandoval, *et. al*, (1991), menciona que la oxidación fenólica para el cultivar Gran Enano en la fase de establecimiento presentó mayor porcentaje con respecto al cultivar Dominicó, una de las causas se debe a las heridas debidas a la manipulación de los explantes, y otra, a que el cultivar Gran Enano fue más propenso a la oxidación, al respecto Roca y Mroginski (1991), menciona que el control más efectivo de esta oxidación son los subcultivos frecuentes y la eliminación de tejidos senescentes de la base de los brotes.

#### 5.1.1.4. Porcentaje de sobrevivencia.

Tabla 11. Análisis de varianza del porcentaje de sobrevivencia.

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F Tab	F cal	Sig.
Método de desinfección (A)	0,2774	2	0,1387	6,504	0,0075	**
Medios de cultivo (B)	0,0012	2	0,0006	0,027	0,9731	NS
Factor A *Factor B	0,1351	4	0,0338	1,583	0,2216	NS
Error	0,3838	18	0,0213			
Total	0,7974	26				

C.V: 8,4 %

De acuerdo al análisis de varianza de la Tabla 11, indica que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos del factor A (métodos de desinfección), mientras que en el Factor B (medios de cultivo) y la interacción (Factor A\*Factor B), no existen diferencias significativas, así mismo se encontró un coeficiente de variación (CV) de 8,4%, los mismos que se encuentra dentro del rango de aceptación para experimentos de cultivos *in vitro*.

Para un mejor análisis se realizó las pruebas de medias correspondientes por el método de Tukey con un nivel de significancia del 5% para el factor A (Método de Desinfección).

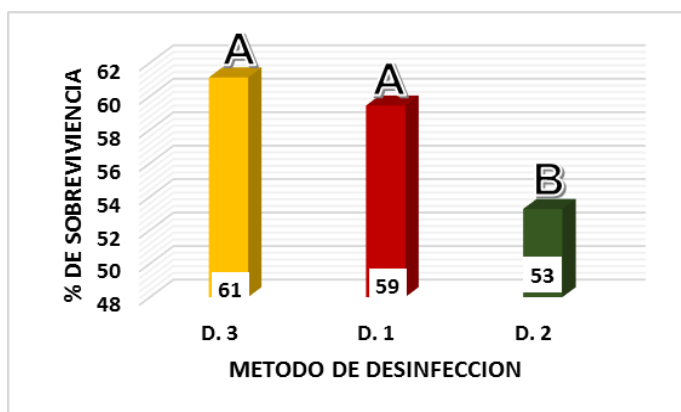


Figura 23. Comparación de medias para el porcentaje de sobrevivencia en diferentes métodos de desinfección.

Nos indica que no existe diferencias significativas en el factor B y la interacción, pero si existe diferencias significativas en el factor A., donde nos muestra que el método de desinfección III; propuesto por (MEDINA 2015) es el que muestra mayor valor de sobrevivencia con un porcentaje de 61%, seguido del método de desinfección I, basado en la (E.E.S. 2018), con 59% de sobrevivencia de las *vitro* plantas.

## 5.2. Fase de establecimiento del material vegetal a condiciones *in vitro*.

Para la siguiente fase de establecimiento de las *vitro* plantas se llegó a tomar en cuenta para altura y diámetro los métodos propuesto por (Ubilla, 2016) y (Catie, 2016) por su alto sobrevivencia de las *vitro* plantas en un tiempo de 20 a 25 días se evaluaron las siguientes variables:

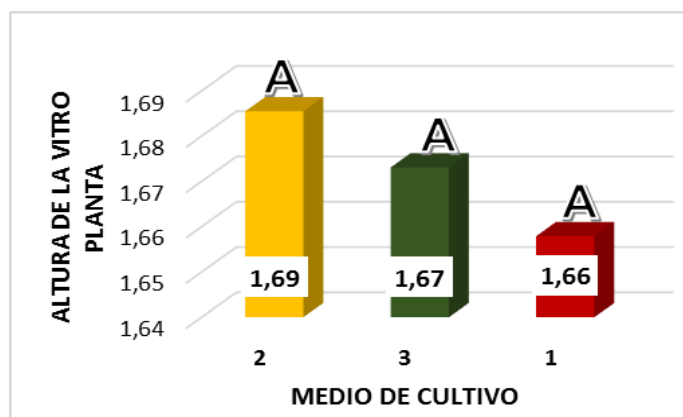
### 5.2.1. Altura de la vitroplanta

**Tabla 12.** Análisis de varianza de altura de las vitroplantas

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F Tab	F cal	Sig.
Medios de cultivo	0,0011	2	0,00057	0,3079	0,74592	NS
Error	0,0112	6	0,00186			
<b>Total</b>	<b>0,0123</b>	<b>8</b>				

CV: 2,6%

Según el análisis de varianza no existen diferencias significativas entre tratamientos para el Factor B (medios de cultivo) en la variable de altura de la *vitro* planta, así mismo se encontró un coeficiente de variación (CV) de 2,6%, lo cual indica que los datos obtenidos en la investigación fueron llevados correctamente se encuentra dentro del rango de aceptación para presente investigación Según el análisis de varianza no existen diferencias significativas entre tratamientos.



**Figura 24.** Comparación de medias para altura de las vitroplantas en diferentes medios de cultivos.

Realizando la comparación de medias entre los tratamientos en la figura 24, se observa que en el medio de cultivo II; propuesto por (Colmenares y Giménez, 2001) fue el que presentó mayor desarrollo de altura de la *vitro* planta obteniendo un valor de 1,69 mm; y el medio de cultivo I; propuesto por (CATIE, 2016), donde existe un menor desarrollo de altura de la *vitro* planta con un valor de 1,66 mm.

### 5.2.2. Diámetro de la vitroplanta

Según el análisis de varianza no existen diferencias significativas para el medio de cultivo en la variable altura de la *vitro* planta

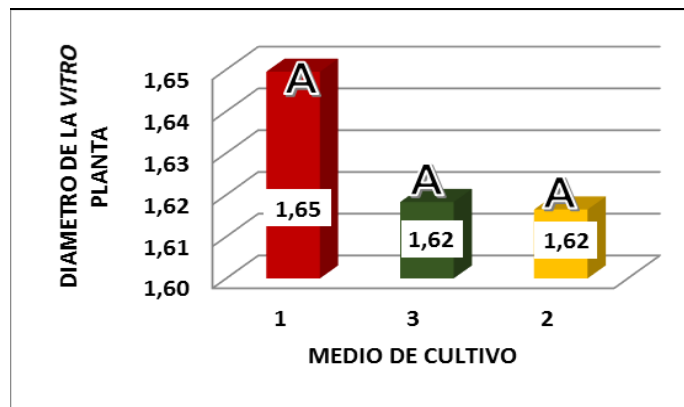
**Tabla 13.** Análisis de varianza del diámetro de las vitroplantas

FUENTE DE VARIACION	SC	GL	CM	F Tab	F cal	Sig.
Medios de cultivo	0,0021	2	0,00103	0,9753	0,42978	NS
Error	0,0064	6	0,00106			
Total	0,0084	8				

CV: 2%

Según el análisis de varianza no existen diferencias significativas entre tratamientos para el Factor B (medios de cultivo) en la variable de diámetro de las vitroplantas, así mismo se encontró un coeficiente de variación (CV) de 2%, lo cual indica que los

datos obtenidos en la investigación fueron llevados correctamente se encuentra dentro del rango de aceptación para presente investigación.



**Figura 25.** Comparación de medias para diámetro de la vitroplanta en diferentes medios de cultivos.

Sin embargo, a pesar de no encontrarse diferencias estadísticamente significativas en el análisis de varianza y realizando la comparación de medias entre los tratamientos en la figura 25, se observa que en el medio de cultivo I; propuesto por (CATIE 2016) fue el que presento mayor desarrollo de diámetro de la vitroplanta obteniendo un valor de 1,65 mm; y en el medio de cultivo II; propuesto por (Colmenares y Giménez, 2001), donde existe una menor desarrollo de diámetro del explante con un valor de 1,62 mm.

Pérez *et al.* (2006) indica que otro factor que puede ser determinante en la contaminación es el tamaño de los explantes que fueron sembrados en la primera etapa del establecimiento del cultivo *in vitro*, para este caso de plátano Dominic Hartón (*Musa* AAB Simmonds), ya que se realizó el corte de los cormos hasta dejarlos de aproximadamente 2cm x 2cm. Colmenares & Giménez (2007) señalaron, que la longitud óptima de los ápices caulinares para el cultivo *in vitro* de bananos (AAA) y plátanos (AAB) debe encontrarse en un rango de 3 a 5 mm y cultivados en medios sólidos, principalmente para evitar el incremento de la contaminación por organismos patógenos.



Sin embargo, los resultados obtenidos son diferentes a los alcanzados por (Gomes Carrera, 2018) quien obtuvo 11,2 mm de altura empleando como explante inicial yemas meristemáticas. (Lopez, 2001) citado por (Gomez Villalba, s./f.) menciona que, Estas diferencias generadas en relación a la altura de vitroplantas, se puede atribuir a la capacidad de división y regeneración celular de organogénesis y embriogénesis somática y al tipo de explante utilizado.

### 5.3. Análisis de costos

Castro, (2003), menciona que el análisis económico es una evaluación que consiste en demostrar la variabilidad de la investigación.

#### 5.3.1. Material vegetal.

El material vegetal fue seleccionado de los predios de la estación experimental con un costo de 4 Bs por hijuelos por unidad, haciendo un total de llevados a cabo al experimento del trabajo propuestos en el área del laboratorio de biotecnología.

#### 5.3.2. Método de desinfección

En el Tabla 14, se pueden observar los costos parciales para los métodos de desinfección de cultivo, según los costos por tratamiento.

**Tabla 14.** Costos parciales para los métodos de desinfección

Insumos de desinfección para la producción de vitroplantas de musa AAA en Bs.	EES (2018) METODO I (Bs).	UBILLA E.(2016) METODO II mod. (Bs).	MEDINA M.(2015) METODO III mod. (Bs).
Detergentes (sólido y/o líquido)	3		
Detergentes (jabón amarillo y verde)		1	1
Agua destilada Estéril	10	10	10
Lavandina	10	10	10
Alcohol	15	15	
<b>Sub total</b>	<b>38</b>	<b>36</b>	<b>21</b>

Los métodos de desinfección propuestos para la investigación (Ubilla 2016 y Medina *et al.* 2015), se modificaron porque no se cuenta con los productos específicos para el trabajo de desinfección.

Se observa que el método de desinfección III (Medina *et al.*, 2015), en el que se presentó menor contaminación, también resulta ser el más económico en su aplicación que fue de 21 Bs., el que tiene mayor costo es el método propuesto por E.E.S. (2018) con un costo total de 38 bs.

### 5.3.3. Medios de cultivo.

Los costos parciales para la introducción de banano en laboratorio en la fase de introducción y establecimiento *in vitro* de Musa AAA. Para cada método propuesto en un medio de cultivo sólido, incluye como costos variables el uso de diferentes medios de cultivo y distintos usos de concentraciones de hormonas de crecimiento, así como también el medio de soporte.

**Tabla 15:** Análisis de costos de medios de cultivo expresado en bolivianos (Bs).

Insumos para la producción de vitroplantes de musa AAA en Bs	E.E.S.	UBILLA E.	MEDINA M.
	MEDIO I	MEDIO II	MEDIO III
sol. A, B, C, D, Y E para 360 ml de Medio de Cultivo.	2.052	2.052	2.052
BAP	3.100		
AG3	2.756		
ANA			3.100
IBA			3.100
Tiamina		0.0014	0.0014
Inositol		0.0020	
Cisteína		0.0014	
Ácido ascórbico		0.0020	
Pantotenato de calcio		0.0020	
Biotin		0.0014	
Gelificante	23.150	23.150	23.150
Sacarosa	0.193	0.193	0.193
<b>Egresos (Bs)</b>	<b>31.058</b>	<b>25.202</b>	<b>31.402</b>

Se puede observar que el medio de cultivo III (MEDINA *et al.*, 2015) es que él cuenta con los más altos costos variables (31.402 Bs) en comparación a los resultados, es el medio de cultivo que presenta menor contaminación, considerando un costo poco menor en el medio de cultivo I (E.E.S. 2108) con un costo de 31.058 Bs., y en el medio de cultivo II, (UBILLA, 2016) es el más económico con un costo de 25.202 Bs.

En relación a los costos variables para el medio de cultivo, se observa que los más altos corresponden a los medios III (31.402) y I (31.058), sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas a nivel de las variables en estudio (altura y diámetro) para el factor B (medios de cultivo).

## 6. CONCLUSIONES

Realizada los análisis de resultados obtenidos en la investigación, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- Los métodos que presentaron mejor eficiencia para los tipos de contaminación fueron, el método de desinfección II, para hongos, y el método de desinfección III para Bacterias y Oxidación.
- El método de desinfección III propuesto por (Medina *et al.*, 2015), presentó mayor porcentaje de sobrevivencia, obteniendo un 61% de sobrevivencia en el trabajo de investigación.
- El medio de cultivo II propuesto por (Colmenares y Giménez, 2001), tuvo mayor altura del promedio aritmético del explante con un 1.69 mm de desarrollo vegetativo.
- El medio de cultivo I propuesto por (CATIE 2016), tuvo mayor diámetro del explante con un 1.65mm de desarrollo vegetativo.
- El mejor método de desinfección (Método III) presenta un costo menor y mejor eficiencia en el control de contaminantes.
- El método de desinfección que mejor resultado para obtener mayor sobrevivencia fue el método III, (planteado por Medina et al., 2015), teniendo un costo de 21 bs.

## 7. RECOMENDACIONES

En base a las conclusiones del trabajo se presenta las siguientes recomendaciones:

- Se recomienda continuar con la investigación utilizando nuevas técnicas de multiplicación *in vitro* como ser: Embriogénesis somática.
- Realizar nuevos métodos de desinfección para la introducción en el cultivo de banano a condiciones *in vitro*.
- Utilizar diferentes medios de cultivo tanto sólidos como líquidos en las distintas fases, con diferentes hormonas de crecimiento, definidas durante todo el proceso *in vitro*.
- A fin de obtener medios de desinfección más económica, probar otros insumos tales como jabón en barra y líquidos, además para la preparación de medios de cultivo utilizar extractos naturales del lugar como el agua de coco, extractos de lenteja, y Aloe Vera.
- Realizar control cotidiano de la temperatura y humedad de la sala de crecimiento.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ancasi. (2016). Determinación un mejor medio de cultivo en la fase de establecimiento para la propagación in vitro de plátano (*Musa paradisiaca* L). *Journal of the Selva Andina Research Society*. La Paz, Bolivia. .
- Araya. (2008). *Agrocadena de Plátano, caracterización*. .
- Ascensio. (2017). Establecimiento de medios decultivo y tipos de explante in vitro de plantas de papa variedad huaycho (*Solanum tuberosum* sp.) para mejorar los sistemas de produccion de semilla. La Paz: Universidad Mayor de San Andres.
- Castillo, A. (s/f). *Propagacion de plantas por cultivo in vitro: una biotecnologia que nos acompaña hace mucho tiempo*.
- Castro. (2016). Implementación de un sistema productivo de banano (*Musa acuminata* AAA) como alternativa sustentable y competitiva para pequeños productores del Municipio de Andes - Antioquia.
- Cervantes. (2013). *Recuperación Del 15n En La Planta De Banano y Suelo De Areas Con Origen Sedimentario*.
- Chipana. (2015). Comportamiento agronómico de ocho variedades de soya (*Glycine max*) en relación a tres densidades de siembra, en la estación experimental de Sapecho, Alto Beni-La Paz.
- Choque. (2013). . *Influencia de la edad del cormo de plátano (*Musa* spp.) de la variedad dominico (AAB) en la propagación con diferentes técnicas de multiplicación en fase de vivero en la estación experimental de Sapecho- La Paz* .
- Condori. (2017). *Caracterización Agromorfologica de seis Variedades del Genero Musa en la Estación Experimental de Sapecho, Alto Beni - La Paz*.

- Cruz. (2012). Cultivo de tejidos vegetales (Manual de prácticas).
- Dávila. (2011). Evaluación de la actividad hormonal de: thidiazuron (TDZ), thidiazuron con ácido  $\alpha$ -naftalen acético (TDZ/ANA) vs. 6- bencil amino purina (BAP), 6-bencil amino purina con ácido  $\alpha$  naftalen acético (BAP/ANA); como inductores de brotes.
- Gamarra. (2014). Regeneración in vitro vía organogénesis y aislamiento de protoplastos de Gmelina arborea a partir de plantas in vitro.
- Herrera. (2011). Manejo Integrado del Cultivo del Platano.
- Ibañez. (2013). Propagación in vitro y estudio con marcadores moleculares y cromosómicos de Limonium perplexum L. Sáez & Rosselló. Disponible .
- INE. (2015). Censo Agropecuario 2013 Bolivia. Instituto Nacional de Estadística.
- INEC, I. N. (2011). Datos Estadísticos Agropecuarios. Encuesta de superficie y producción.
- INIAP. (2014). Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Programa Nacional del Banano y Plátano.
- LEONARDO M. et al. (2012). El cultivo de platano (*Musa paradisiaca* L.) en Panama. Pag. 21-22
- Levitus. (2010). Biotecnología y Mejoramiento II.
- Llanqui. (2011). Efecto del agua de coco en la micropropagación del plátano (*Musa* AAB) y banano (*Musa* AAA) en medios de cultivo sólido y líquido.
- Lopez. (2010). Organogénesis directa de Novo en *Musa* AAA “Enano Gigante” y “FHIA 23”.
- Mendez. (2014). “Efectos de cinco dosis de Quitosano para el establecimiento *in vitro* del plátano dominico Hartón (*Musa* AAB Simmonds) en la zona de Daule”.

- Mercado. (2006). Efecto de la cobertura vegetal de leguminosas en la producción de banano orgánico cv. Enano Gigante *Musa acuminata*, en Sud Yungas, La Paz.
- Mroginski, R. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura, fundamentos y aplicación. Disponible en: <http://www.ebookdb.org/reading/201A26181E6412777A361269/Cultivo-De-Tejidos-En-La-Agricultura--Fundamentos-Y-Aplicaciones>
- Murillo, R. (2014). Introducción a la Biotecnología Agrícola: Historia del cultivo de tejidos vegetales. Esp. 1° ED. Bo. MMAYA. 101p. .
- Ortega. (2011). Establecimiento aséptico en la micropropagación in vitro de Banano Williams (AAA, subgrupo Cavendish).
- Patricio. (2018). Propagación in vitro de Banano (*Musa acuminata* cv. "Gran enano") en diferentes condiciones de incubación.
- Pedranzani. (2018). Cultivo *in vitro*: Conservación y Producción.
- Poroma, D. (2005). Alternativas de manejo de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano orgánico (*Musa* AAA) cv. "Gran naine" en Alto Beni.
- PRO-ECUADOR. (2016). Análisis sectorial de banana. Recuperado de: [http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/PROEC\\_AS2016\\_BANANO.pdf](http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2016/09/PROEC_AS2016_BANANO.pdf).
- PROMUEVE BOLIVIA. (2014). Unidad de apoyo al exportador. Producto Banana. Perfil producto banana.
- Quispe. (2010). evaluación de dos medios de cultivo y diferentes concentraciones de benzil amino purina (bap) en la multiplicación in vitro de seis accesiones del género *Musa* (*Musa acuminata* y *Musa balbisiana*).
- Reyes. (1999). Diseño de experimentos aplicados, México, DF. Trillas. 90p.



- Rivera. (2011). Eficacia de beauveria bassiana (balsamo) vuillemin .
- Robinson. (2012). .Platanos y bananas. Mundi – Prensa.
- Rojas, V. (s.f.). Guia Metodologica de Diseños Experimentales. Universidad Mayor de San Andres. .
- Sanchez. (2013). La materia orgánica y su importancia en la productividad bananera I.A. MSC. - Investigadores Cenibanano, Colombia.
- Sharry. (2015). Plantas de probeta. Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos in vitro.
- Tandazo. (2014). Propagación in vitro de banano, mediante la utilización de meristemas caulinares.
- Ubilla. (2016). Propagación in vitro de Banano (Musa acuminata) -variedades Gros Michel y Williams- a partir de meristema .
- Vargas. (2012). El Cultivo del Banano en el Tropico.

# **ANEXOS**

### **ANEXO Nº 1: Preparación de las soluciones Stock Murashige y Skoog (1962).**

La solución Stock o solución madre está basada en las sales minerales de Murashige Skoog (1962), y está compuesta de cinco soluciones concentradas que son: Solución A, B, C, D y E.

#### **Solución AX10 (Para 10 litros de medio de cultivo)**

<b>NOMBRE</b>	<b>FORMULA QUIMICA</b>	<b>PESO (mg)</b>
Nitrato de amonio	<b>NH<sub>4</sub> NO<sub>3</sub></b>	16500
Nitrato de potasio	<b>KNO<sub>3</sub></b>	19000
Cloruro de calcio dihidratado	<b>CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O</b>	4400
Fosfato monobásico de potasio	<b>KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub></b>	1700
Ácido bórico	<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	62
Sulfato de manganeso tetrahidratado	<b>MnSO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O</b>	223
Sulfato de zinc heptahidratado	<b>ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O</b>	86
Molibdato de sodio	<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub></b>	2,5
Sulfato de cobre Pentahidratado	<b>CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O</b>	0,25
Cloruro de cobalto hexahidratado	<b>CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O</b>	0,25
Ioduro de potasio	<b>KI</b>	8,2

Todas las sales mencionadas se prepararon de forma individual disolviendo en 10 a 25 ml de agua destilada, posteriormente se vertió en una probeta de 500 ml que contenía 100 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.

### **Solución BX10 (Para 10 litros de medio de cultivo)**

Se pesó 3700 mg de sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), y se disuelve en 500 ml de agua destilada.

### **Solución Cx10 (Para 10 litros de medio de cultivo)**

Se pesó 372,5 mg de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , que fue disuelto en 25 ml de agua destilada, seguido a esto se pesó 278,5 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  que fue disuelto en 25 ml de agua destilada, las dos soluciones se mantuvieron en constante agitación hasta su completa disolución concluido esto se pasa a mezclar para después completar a 500 ml.

<b>NOMBRE</b>	<b>FORMULA</b>	<b>PESO (mg)</b>
Etilen diamin tetraacetato disódico	<b><math>\text{Na}_2 \text{EDTA}</math></b>	372,5
Sulfato ferroso heptahidratado	<b><math>\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}</math></b>	278,5

### **Solución Dx10 (Para 10 litros de medio de cultivo)**

Se disolvió en 500 ml de agua destilada 1000 mg de myo-inositol.

### **Solución Ex10 (Para 10 litros de medio de cultivo)**

<b>VITAMINAS</b>	<b>PESO (mg)</b>
Tiamina-HCl	<b>10</b>
Glicyna	<b>50</b>
Acido nicotínico	<b>12,5</b>
Piridoxina - HCl	<b>12,5</b>

Se disolvió cada vitamina por separado y completo hasta 250 ml con  $\text{H}_2\text{O}_d$ .

**ANEXO N° 2: Preparaciones de las Solución de reguladores de crecimiento.**

<b>COMPONENTE</b>	<b>REACTIVO</b>	<b>CONCENTRACION (mg/L)</b>
6 Bencil aminopurina	BAP	2,7
Ácido Indolacético	AIA	0,3
Ácido Giberelico	AG <sub>3</sub>	2,0
Ácido Naftalenacetico	ANA	0,5
Ácido Indol-3-butirico	IBA	0,5

**ANEXO N° 3: Medios de cultivo para los meristemos apicales.**

**Medios de cultivo de introducción**

<b>Insumos para la producción de vitroplantes de musa AAA en Bs</b>	<b>E.E.S.</b>	<b>COLMENARES Y GIMENEZ</b>	<b>MEDINA M.</b>
	<b>MEDIO 1</b>	<b>MEDIO 2</b>	<b>MEDIO 3</b>
<b>sol. A, B, C, D, Y E para 360 ml de Medio de Cultivo.</b>	2.052	2.052	2.052
<b>BAP</b>	3.100		
<b>AG3</b>	2.756		
<b>ANA</b>			3.100
<b>IBA</b>			3.100
<b>Tiamina</b>		0.0014	0.0014
<b>Inositol</b>		0.0020	
<b>Cisteína</b>		0.0014	
<b>Ácido ascórbico</b>		0.0020	
<b>Pantotenato de calcio</b>		0.0020	
<b>Biotin</b>		0.0014	
<b>Gelificante</b>	23.150	23.150	23.150
<b>Sacarosa</b>	0.193	0.193	0.193
<b>Egresos (Bs)</b>	<b>31.058</b>	<b>25.202</b>	<b>31.402</b>

**Medios de cultivo de establecimiento**

<b>Insumos para el establecimiento de vitroplantes de(Musa AAA) en Bs</b>	<b>E.E.S.</b>	<b>COLMENARES Y GIMENEZ</b>	<b>MEDINA M.</b>
	<b>MEDIO 1</b>	<b>MEDIO 2</b>	<b>MEDIO 3</b>
<b>sol. A, B, C, D, Y E para 360 ml de Medio de Cultivo.</b>	2.052	2.052	2.052
<b>BAP</b>	3.100		
<b>AIA</b>	3.100		

<b>AG3</b>	2.756		2.756
<b>ANA</b>			3.100
<b>IBA</b>			3.100
<b>Tiamina</b>		0.0014	0.0014
<b>Inositol</b>		0.0020	
<b>Cisteína</b>		0.0014	
<b>Ácido ascórbico</b>		0.0020	
<b>Pantotenato de calcio</b>		0.0020	
<b>Biotin</b>		0.0014	
<b>Gelificante</b>	23.150	23.150	23.150
<b>Sacarosa</b>	0.193	0.193	0.193
<b>Egresos (Bs)</b>	<b>31.058</b>	<b>25.202</b>	<b>31.402</b>

#### **ANEXO Nº 4: Métodos de desinfección para los meristemos apicales.**

##### ➤ **Método de desinfección (I).**

El método de desinfección I utilizado en la investigación fue propuesta por Posada, (2004) quien utilizó como explante inicial yemas axilares de papaya obtenidas de campo abierto.

##### **METODO DE DESINFECCION (I) - (E.E.S. 2018)**

<b>Solución</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Concentración (%)</b>
Hipoclorito de sodio	15	5,5
Alcohol	10	70
Hipoclorito de sodio	2	2
Ácido cítrico	8 a 10 s	200mg/L

##### ➤ **Método de desinfección (II).**

##### **METODO DE DESINFECCION (II) - (UBILLA, 2016)**

<b>Solución</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Concentración (%)</b>
Hipoclorito de sodio	15	0,5
Alcohol	15	70

➤ **Método de desinfección (III).**

<b>METODO DE DESINFECCION ( III ) - (MEDINA 2015)</b>		
<b>Solución</b>	<b>Tiempo (min)</b>	<b>Concentración (%)</b>
Hipoclorito de sodio	10	5,5
Hipoclorito de sodio	20	3
8 Días de oscuridad		

### ANEXO Nº 3: Esquema fotográfico; Establecimiento y desarrollo de los meristemas apicales.

- Selección



Planta madre



Hijuelos (Explantos)



Traslado a laboratorio

- Desinfección externa



Corte y lavado



Agua y detergente



Corte y detergente



- **Introducción de meristemas apicales (FDCFL)**



Desinfección (Hipoclorito de sodio+ agua destilada)



Desinfección (detergente liquido + agua destilada)

- **Introducción de meristemas apicales (DDCFL)**



Desinfección de material estéril



Desinfección (Alcohol al 70%)



Desinfección (hipoclorito de sodio al 3%)

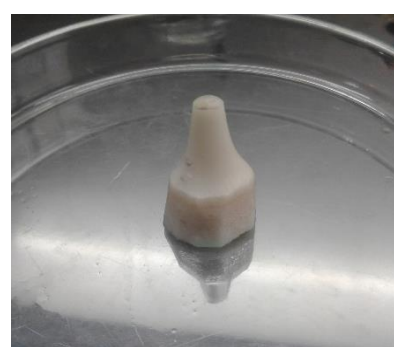
- **Disección y extracción del explante.**



Disecciones laterales



Disección interna



Disección optimo 2X2cm

- Establecimiento de vitroplantas en desarrollo de 25 a 30 días de establecimiento.



Desarrollo vegetativo de las vitro plantas

- Altura y Diámetro de la vitro planta



Altura de la vitro planta



Diámetro de la vitro planta

**ANEXO N° 4: Esquema fotográfico; Contaminación (Hongo, bacteria y oxidación)**



Contaminación por hongos

Contaminación por bacterias



Oxidación fenológica

## ANEXO N° 7: Procesamiento de análisis de varianza, con el programa InfoStat

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
HONGO	27	0,50	0,28	5,29

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,13	8	0,02	2,25	0,0730
FA	0,06	2	0,03	4,50	0,0260
FB	0,02	2	0,01	1,50	0,2497
FA*FB	0,04	4	0,01	1,50	0,2440
Error	0,13	18	0,01		
Total	0,25	26			

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10115

Error: 0,0071 gl: 18

	FA	Medias	n	E.E.
M. Desinfección	3	1,55	9	0,03 A
M. Desinfección	2	1,55	9	0,03 A
M. Desinfección	1	1,66	9	0,03 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10115

Error: 0,0071 gl: 18

	FB	Medias	n	E.E.
Medios de cultivo	1	1,55	9	0,03 A
Medios de cultivo	2	1,59	9	0,03 A
Medios de cultivo	3	1,62	9	0,03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,24053

Error: 0,0071 gl: 18

	FA	FB	Medias	n	E.E.
M. Desinfección	2	Medios de cultivo	3	1,55	3 0,05 A
M. Desinfección	3	Medios de cultivo	1	1,55	3 0,05 A
M. Desinfección	3	Medios de cultivo	2	1,55	3 0,05 A
M. Desinfección	3	Medios de cultivo	3	1,55	3 0,05 A
M. Desinfección	2	Medios de cultivo	2	1,55	3 0,05 A
M. Desinfección	1	Medios de cultivo	1	1,55	3 0,05 A
M. Desinfección	2	Medios de cultivo	1	1,55	3 0,05 A
M. Desinfección	1	Medios de cultivo	2	1,66	3 0,05 A
M. Desinfección	1	Medios de cultivo	3	1,76	3 0,05 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
BACTERIA	27	0,45	0,21	3,09

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,04	8	4,4E-03	1,84	0,1345
FA	0,02	2	0,01	3,47	0,0532
FB	0,01	2	0,01	2,13	0,1481
FA*FB	0,01	4	2,1E-03	0,88	0,4933
Error	0,04	18	2,4E-03		
Total	0,08	26			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05882**

Error: 0,0024 gl: 18

	FA	Medias	n	E.E.	
M. Desinfección	3	1,55	9	0,02	A
M. Desinfección	1	1,58	9	0,02	A B
M. Desinfección	2	1,61	9	0,02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,05882**

Error: 0,0024 gl: 18

	FB	Medias	n	E.E.	
Medios de cultivo	3	1,55	9	0,02	A
Medios de cultivo	1	1,59	9	0,02	A
Medios de cultivo	2	1,60	9	0,02	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13987**

Error: 0,0024 gl: 18

	FA	FB	Medias	n	E.E.	
M. Desinfección	3	Medios de cultivo	3	1,55	3	0,03 A
M. Desinfección	2	Medios de cultivo	3	1,55	3	0,03 A
M. Desinfección	3	Medios de cultivo	1	1,55	3	0,03 A
M. Desinfección	3	Medios de cultivo	2	1,55	3	0,03 A
M. Desinfección	1	Medios de cultivo	3	1,55	3	0,03 A
M. Desinfección	1	Medios de cultivo	1	1,59	3	0,03 A
M. Desinfección	1	Medios de cultivo	2	1,59	3	0,03 A
M. Desinfección	2	Medios de cultivo	1	1,64	3	0,03 A
M. Desinfección	2	Medios de cultivo	2	1,65	3	0,03 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
FENOLIZACION	27	0,71	0,58	5,81

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,40	8	0,05	5,57	0,0012
FA	0,19	2	0,10	10,75	0,0008
FB	0,08	2	0,04	4,36	0,0286
FA*FB	0,13	4	0,03	3,58	0,0258
Error	0,16	18	0,01		
Total	0,56	26			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11389**

Error: 0,0090 gl: 18

	FA	Medias	n	E.E.	
M. Desinfección	3	1,55	9	0,03	A
M. Desinfección	2	1,59	9	0,03	A
M. Desinfección	1	1,75	9	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11389**

Error: 0,0090 gl: 18

	FB	Medias	n	E.E.	
Medios de cultivo	1	1,55	9	0,03	A
Medios de cultivo	3	1,67	9	0,03	B
Medios de cultivo	2	1,67	9	0,03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,27083**

Error: 0,0090 gl: 18

FA	FB	Medias n	E.E.
M. Desinfección 2	Medios de cultivo 2	1,55 3	0,05 A
M. Desinfección 3	Medios de cultivo 1	1,55 3	0,05 A
M. Desinfección 3	Medios de cultivo 2	1,55 3	0,05 A
M. Desinfección 3	Medios de cultivo 3	1,55 3	0,05 A
M. Desinfección 2	Medios de cultivo 1	1,55 3	0,05 A
M. Desinfección 2	Medios de cultivo 3	1,66 3	0,05 A B
M. Desinfección 1	Medios de cultivo 3	1,79 3	0,05 A B
M. Desinfección 1	Medios de cultivo 2	1,90 3	0,05 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
SOBREVIVIENCIA	27	0,52	0,30	8,40

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,41	8	0,05	2,42	0,0566
FA	0,28	2	0,14	6,50	0,0075
FB	1,2E-03	2	5,8E-04	0,03	0,9731
FA*FB	0,14	4	0,03	1,58	0,2216
Error	0,38	18	0,02		
Total	0,80	26			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17568**

Error: 0,0213 gl: 18

FA	Medias n	E.E.
M. Desinfección 3	1,60 9	0,05 A
M. Desinfección 1	1,78 9	0,05 B
M. Desinfección 2	1,83 9	0,05 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,17568**

Error: 0,0213 gl: 18

FB	Medias n	E.E.
Medios de cultivo 1	1,73 9	0,05 A
Medios de cultivo 2	1,74 9	0,05 A
Medios de cultivo 3	1,75 9	0,05 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,41776**

Error: 0,0213 gl: 18

FA	FB	Medias n	E.E.
M. Desinfección 3	Medios de cultivo 1	1,60 3	0,08 A
M. Desinfección 3	Medios de cultivo 2	1,60 3	0,08 A
M. Desinfección 3	Medios de cultivo 3	1,60 3	0,08 A
M. Desinfección 1	Medios de cultivo 1	1,66 3	0,08 A
M. Desinfección 2	Medios de cultivo 3	1,74 3	0,08 A
M. Desinfección 1	Medios de cultivo 2	1,79 3	0,08 A
M. Desinfección 2	Medios de cultivo 2	1,83 3	0,08 A
M. Desinfección 1	Medios de cultivo 3	1,90 3	0,08 A
M. Desinfección 2	Medios de cultivo 1	1,93 3	0,08 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )



### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Altura del explante	9	0,09	0,00	2,58

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,1E-03	2	5,7E-04	0,31	0,7459
FA	1,1E-03	2	5,7E-04	0,31	0,7459
Error	0,01	6	1,9E-03		
Total	0,01	8			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,10801**

Error: 0,0019 gl: 6

FA	Medias	n	E.E.
Medios de cultivo 1	1,66	3	0,02 A
Medios de cultivo 3	1,67	3	0,02 A
Medios de cultivo 2	1,69	3	0,02 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Diametro Medio del explant..	9	0,25	0,00	2,00

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,1E-03	2	1,0E-03	0,98	0,4298
FA	2,1E-03	2	1,0E-03	0,98	0,4298
Error	0,01	6	1,1E-03		
Total	0,01	8			

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,08159**

Error: 0,0011 gl: 6

FA	Medias	n	E.E.
Medios de cultivo 2	1,62	3	0,02 A
Medios de cultivo 3	1,62	3	0,02 A
Medios de cultivo 1	1,65	3	0,02 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )