



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA

**Trabajo Experimental presentado al H. Consejo Directivo como
requisito previo a la obtención del título de:**

INGENIERO AGROPECUARIO

TEMA:

“Establecimiento *in vitro* de musáceas (AA, AAA, AAB) vía organogénesis directa”.

AUTOR:

Miguel Antonio Mora Mackensen

ASESOR:

Walter Oswaldo Reyes Borja, Ph.D.

Babahoyo - Los Ríos – Ecuador

2017



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AGROPECUARIA



TRABAJO DE TITULACION

TRABAJO EXPERIMENTAL PRESENTADO AL H. CONSEJO DIRECTIVO
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERO AGROPECUARIO

TEMA:

"ESTABLECIMIENTO *IN VITRO* DE MUSACEAS (AA, AAA, AAB) VÍA
ORGANOGENESIS DIRECTA".

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

TRIBUNAL:

Ing. Agr. Álvaro Pazmiño Pérez, MSc
Presidente

Ing. Agr. Cristina Maldonado
Camposano, MBA
Vocal

Ing. Agr. David Mayorga Arias, MBA
Vocal

DEDICATORIA

Cuando alcanzamos nuestras metas más anheladas, no debemos olvidar a quienes nos ayudaron a llegar a la misma; es por esto que dedico este triunfo académico a: Dios primeramente, por ser el pilar que sostiene mi vida y todos mis ideales, ya que sin su infinita bondad nada podría ser posible.

A mis padres Zenón Mora Briones y Germania Mackensen Macías, que desde mi niñez han sido ejemplos de superación, responsabilidad y de virtudes inigualables; además de apoyarme desinteresadamente en todos mis planes y proyectos, a mis hermanos Marcelo y José, a mi hermana Margoth y demás familiares quienes son motivo de superación. Por el cariño y el apoyo incondicional que me han brindado cada día.

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradezco a Dios por bendecirme cada día por darme sabiduría e inteligencia para poder alcanzar esta meta de muchas en mi vida.

Gratitud sincera a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Babahoyo, por haberme aceptado ser parte de ella formándome como profesional; agradezco a cada uno de los docentes , personas de gran sabiduría quienes compartieron sus conocimientos siendo ellos parte de este proceso integral de formación, ayudándome a llegar al punto en el que me encuentro.

A mi director de tesis Ing. Agr. Walter Oswaldo Reyes Borja Ph.D docente investigador; por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mi trabajo de investigación, por la colaboración, el apoyo, la confianza y por su amistad así como su respeto.

Agradezco a los Ingenieros. Lenin Arana Vera, Jorge Borja Portilla y Viviana Arana Vera, por la entrega y las ganas de impartir sus conocimientos y experiencias sin condición alguna, por su valiosa orientación, tiempo y enseñanza que sin duda han sido de gran aporte en mi formación así como en este trabajo de investigación.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Egdo. Wilmer Saltos Pérez, John Sotomayor Andrade y Adrián Lamilla Moreno, por su colaboración y amistad brindada. A mis compañeros de salón de clases que gracias a su compañerismo y apoyo moral han aportado en mis ganas de superación.

La responsabilidad por la investigación
Análisis, resultados, conclusiones y
recomendaciones presentadas y
sustentadas en este trabajo
experimental son de exclusividad del
autor.

Miguel Antonio Mora Mackensen

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
General	4
Específicos	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Origen del banano.....	5
2.2. Morfología y taxonomía de las musáceas	6
2.3. Cultivo de tejidos.....	7
2.4. Organogénesis directa	8
2.5. Micropropagación de musáceas	9
2.6. Materia vegetal.....	10
2.7. Establecimiento del cultivo	11
2.8. Propagación <i>in vitro</i>	16
2.9. Enraizamiento y aclimatación.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Ubicación	23
3.2. Material genético.....	23
3.3. Factor estudiado	24
3.4. Tratamientos estudiados	24

3.5. Métodos	25
3.6. Diseño experimental	25
3.7. Manejo del experimento	25
3.8. Variables evaluadas	30
3.8.1. Contaminación de explantes.....	30
3.8.2. Fenolización de explantes	30
3.8.3. Establecimiento de los explantes.....	30
IV. RESULTADOS	31
4.1. Contaminación de explantes	31
4.2. Fenolización de los explantes	32
4.3. Establecimiento de los explantes	33
V. DISCUSIÓN	37
VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	39
6.1. CONCLUSIONES	39
6.2. RECOMENDACIONES	40
VII. RESUMEN	41
VIII. SUMMARY	43
IX. LITERATURA CITADA	44
X. ANEXOS.....	51

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Lista de los 11 cultivares de musáceas de genomas AA, AAA, AAB utilizados en el experimento.....	23
Tabla 2. Contaminación de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología, FACIAG – UTB. Los Ríos, Babahoyo - Ecuador, 2017.....	31
Tabla 3. Fenolización de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG – UTB. Los Ríos, Babahoyo - Ecuador, 2017.....	32
Tabla 4. Establecimientos de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG – UTB. Los Ríos, Babahoyo - Ecuador, 2017.....	33
Tabla 5. Evaluación del tratamiento 1, de los cultivares de Banano y Plátano evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG – UTB. Los Ríos, Babahoyo - Ecuador, 2017.	34
Tabla 6. Evaluación del tratamiento 2, de los cultivares de Banano y Plátano evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG – UTB. Los Ríos, Babahoyo - Ecuador, 2017.	35

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Selección y reducción del corno: hijuelo de 1 metro de altura aproximadamente (A); reducción del corno (B); corno reducido a 5x5 cm (C); corno sumergido en ácido ascórbico (D).....	27
Figura 2. Desinfección del corno: cornos introducidos en alcohol (A); corno introducido en cloro (B); corno en enjuagues con agua destilada esterilizada (C).....	28
Figura 3. Siembra in vitro de los ápices meristemáticos: extracción del ápice meristemático (A); ápice meristemático de 3 cm listo para la siembra (B); ápice meristemático sembrado en medio de inducción (C); ápice meristemático en cuarto oscuro (D).....	29
Figura 4. Contaminación de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG - UTB - Ecuador, 2017.....	31
Figura 5. Fenolización de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología de la FACIAG - UTB - Ecuador, 2017.....	32
Figura 6. Establecimiento de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG - UTB - Ecuador, 2017.....	33
Figura 7. Explantes contaminados (A); explantes fenolizados (B); explantes establecidos (C) y (D).....	36

I. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador la producción de plátano (*Musa*, AAB) y banano (*Musa*, AAA) es una actividad generadora de ingresos y empleo. Una parte del plátano está dedicada al alimento básico del país y otra a la exportación, mientras que toda la producción de banano está dedicada a la exportación (AEBE, 2010).

Hoyos & Jaramillo (2012), mencionan que las musáceas son plantas de ambientes tropicales y sub tropicales y por su aceptación en el mercado, el banano y el plátano son cultivos que se han difundido a extensas zonas de Centro y Sudamérica, siendo fuentes de alimentación para algunos de sus países. La mayoría de los cultivares de banano y plátano tuvieron origen en dos especies silvestres: *Musa acuminata* (AA) y *Musa balbisiana* (BB) que por poliploidía e hibridación generaron las variedades cultivadas actualmente.

Los programas de mejoramiento genético de musáceas se han orientado principalmente al desarrollo de variedades resistentes a plagas y enfermedades. Las estrategias se han centrado en aspectos agronómicos como rendimiento, características organolépticas, tolerancia a estrés, vida útil, contenido de minerales, absorción de agua y resistencia mecánica a daños (Bakry *et al.*, 2008).

Desde 1972 las técnicas *in vitro* han sido utilizadas para el saneamiento y la multiplicación acelerada de diferentes clones del género *Musa* mediante el empleo de ápices o meristemas. Estas técnicas propiciaron el intercambio de germoplasma *in vitro*, dentro y entre países, con una alta seguridad de no transmitir enfermedades;

permitiendo el desarrollo de técnicas para la conservación y la crioconservación in vitro y métodos de cultivo de tejido en apoyo al mejoramiento genético (Berg y Bustamante, 1974).

Müller & Sandoval (1986), citado por Méndez (2014), mencionan que el método consiste en cultivar asépticamente el “meristemo” proveniente de hijuelos, en un medio nutritivo artificial; luego, mediante la adición de reguladores de crecimiento al medio de cultivo, se estimula la multiplicación y la obtención de plantas completas debido a la totipotencia inherente en las células vegetales.

La técnica del cultivo in vitro, aunque presenta algún peligro de reinfección en el campo, permite producir material libre de patógenos, establecer cultivos con plantas sanas, y evitar así la diseminación de enfermedades (Angarita y Perea, 1984).

Se ha observado que las tasas de proliferación de estos tejidos cultivados no son uniformes y dependen de factores como el tamaño del brote empleando como explante, el número de brotes subcultivados, el tipo de corte que se emplee (trasversal o longitudinal, es decir, de arriba abajo del ápice), la consistencia del medio de cultivo (líquido o sólido), y el estado fisiológico del tejido. La inducción, el control del crecimiento, y la morfogénesis están determinados por las relaciones hormonales suministradas en el medio de cultivo (Angarita y Perea, 1984).

Otra dificultad práctica de la propagación in vitro de las Musáceas es la oxidación de polifenoles, especialmente en algunos cultivares; se ha observado que el cultivar como Gran Enano (AAA) no ofrecen grandes dificultades; sin embargo

otro cultivar como Maqueño (AAB) presentan elevadas tasas de oxidación de polifenoles. El control más efectivo de esta oxidación son los subcultivos frecuentes y la eliminación de tejidos senescentes de la base de los brotes (Angarita y Perea, 1984).

Ortega et al., (2011), citado por Méndez (2014), indica que la multiplicación in vitro ha permitido la reproducción masiva de la especie para plantaciones comerciales. Sin embargo; una de las limitantes para la micropropagación in vitro de musáceas, ha sido la alta tasa de contaminación en los explantes en la etapa I del cultivo, debido principalmente a contaminación endógena, acentuada en zonas tropicales, donde las condiciones de alta temperatura y pluviosidad hacen que los microorganismos encuentren un hospedero ideal en esta especie.

En este estudio, se establecieron los protocolos para la desinfección de los explantes iniciales de algunos clones de musáceas, y la respuesta fenólica que incidieron en su establecimiento.

OBJETIVOS

General

- Estandarizar un protocolo para el establecimiento *in vitro* de musáceas vía organogénesis directa.

Específicos

- Establecer *in vitro* 11 accesiones de musáceas de genomas AA, AAA, AAB.
- Evaluar el establecimiento de los explantes en dos protocolos de inducción.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Origen del banano

El banano es un cultivo tropical, que con exactitud no se ha establecido su origen; pero se considera proveniente del sudoeste Asiático, posiblemente de las regiones de Malasia, China meridional e Indonesia; desde donde se difundió en la costa oriental y central de África e islas Canarias (Perea, 2003).

Vargas, J. (2009), citado por Álvarez (2014), considera que el banano es uno de los cultivos más importantes en el mundo, ocupando este frutal el cuarto lugar en importancia, después del arroz, trigo y la leche. Los bananos son consumidos extensivamente en los trópicos donde son cultivados, y en las zonas templadas es apreciado por su sabor, gran valor nutritivo y por la disponibilidad durante todo el año. Tan solo en el Centro y Oeste de África constituye la fuente principal de alimentación de 270 millones de personas.

James (2009), indica que en Ecuador la verdadera comercialización bananera se inicia en la década de 1950, aunque en la provincia de El Oro se tiene registro de su producción desde 1925 comercializando hacia los mercados de Perú y Chile.

2.2. Morfología y taxonomía de las musáceas

Es una hierba estolonífera. El sistema radicular en las musáceas es fasciculado y fibroso, característico de las plantas monocotiledóneas, formando un sistema entrecruzado de raíces primarias, secundarias, siendo muy superficial.

Su tallo verdadero corresponde a un cormo subterráneo erecto con ramificación monopódica que permanece corto hasta su diferenciación floral. En el ápice se encuentra anidado el meristemo apical, rodeado por la base de las hojas diferenciadas. Sobre la superficie del cormo se pueden apreciar nudos y entrenudos; en la base de cada entrenudo se encuentran insertas las yemas en forma opuesta no axilar, su posición guarda una relación muy estrecha con la distribución de las hojas sobre el tallo, sus hojas, son grandes y oblongadas, dispuestas en espiral, poseen pseudopetiolos largos, que se ensanchan en vainas cuyo conjunto forma el pseudotallo, sus flores frecuentemente unisexuales, ovario adherente interno, de naturaleza partenocárpico, sépalos coloreados. La inflorescencia puede ser péndula, semipéndula o erecta, con brácteas, generalmente decíduas de superficie lisa o surcada, convoluta más o menos imbricada en la bellota, su fruto es carnoso; las semillas irregularmente globosas, lenticulares o cilíndricas, cuando se producen en el caso de ciertos diploides. Nacen en un racimo compuesto de varios grupos llamados manos, los cuales se desarrollan en la panícula floral o vástago, las manos desarrollan entre 10 a 12 frutos llamados dedos para el caso de la variedad hartón, los cuales están arreglados en dos hileras creciendo en espiral al rededor del vástago. Su reproducción es netamente vegetativa; por lo tanto, la principal vía de

transmisión de características hereditarias como también problemas sanitarios es por medio de colinos, rizomas o yemas vegetativas (Belalcázar y Valencia, 1991).

Según Simmonds (1962), las musáceas pertenecen a la División: Embriophita, Subdivisión: Angiospermae, Clase: Monocotiledónea, Orden: Escitaminales o Zingiberales, Familia: Musáceas, Subfamilia: Musoidae, Género: Musa L.

2.3. Cultivo de tejidos

Levitus et al (2010), citado por Valarezo (2015), menciona que las técnicas que tienen en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos, células, tejidos u órganos) es cultivado asépticamente en un medio artificial de composición química definida, en condiciones ambientales controladas.

El cultivo de tejidos o propagación in vitro abarca tanto el cultivo aséptico de tejidos como de células y órganos. Se llama in vitro debido a que se cultiva en recipientes de vidrio o plástico transparente. Esta técnica consiste en cultivar un inóculo con potencialidad balanceada de nutrientes y hormonas. Esta capacidad de regenerar no solamente tejidos y órganos, sino también una planta entera es única en plantas. Se define al cultivo de tejidos como un conjunto de técnicas con las cuales se ejerce un control relativo sobre los procesos morfológicos, fisiológicos y

bioquímicos que se llevan a cabo en los tejidos bajo estudios (Abdelnour & Escalant, 1994).

El cultivo de células vegetales no sería posible sin el principio de la totipotencialidad, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece, sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa, entonces se puede decir que de acuerdo a los principios anteriormente mencionados, las condiciones favorables, en especial un balance hormonal apropiado, da origen a un nuevo individuo (Calva & Pérez, 2005).

2.4. Organogénesis directa

En términos generales, en los cultivos de callos se inducen proliferaciones más o menos aleatorias, a partir de explantes tomados de varias partes de plantas, para formar brotes y raíces (Krikorian, 1993).

Uno de los procesos morfogenéticos más comúnmente utilizado, para la obtención de nuevas formas y estructuras como órganos (brotes) directamente, sin la formación de callos se denomina organogénesis directa (Krikorian, 1993).

Toda célula u órgano está en capacidad de recapitular la información genética que posee y a través de la diferenciación celular formar y desarrollar una planta completa con características idénticas (INIA, 2005).

Cardozo (2005) citado por Gamarra (2014), menciona que las plantas in vitro se propagan clonalmente por organogénesis directa para mejorar los rangos de multiplicación, así como para obtener plantas transgénicas, si bien es más frecuente la descripción de protocolos de transformación genética vía organogénesis indirecta.

2.5. Micropropagación de musáceas

El cultivo de tejidos es una herramienta invaluable para resolver los problemas sanitarios que traen consigo la propagación y el mejoramiento genético de banano y plátanos en el mundo (Angarita & Perea, 1993).

Consiste prácticamente en la multiplicación masiva in vitro de un explante proveniente de un cultivar asépticamente establecido una vez se haya regenerado (Villalobos & Thorpe, 1993).

El banano al igual que el plátano son cultivos estériles, por su condición triploide. La propagación de clones comestibles por vía vegetativa de manera convencional, ha sido usada por mucho tiempo, pero con la aparición de la técnica de cultivo de tejidos mediante la micropropagación in vitro los resultados han sido muy favorables, ya que se puede obtener mayor cantidad de material genético en menor tiempo y libre de patógenos (Angarita & Perea, 1993).

Por fortuna, el género *Musa* puede multiplicarse rápidamente mediante las técnicas de micropropagación. El cultivo de meristemas hace posible la erradicación

de agentes patógenos y permite no solo los intercambios de germoplasma sano sino la multiplicación comercial de bananos. La micropropagación in vitro ha permitido también propagar rápidamente y evaluar mutantes espontáneos con características agronómicas interesantes (Angarita & Perea, 1993).

2.6. Materia vegetal

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. 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 inducción para poder controlar la sanidad y la viabilidad, luego de realizar la desinfección del material con hipoclorito de sodio, durante un período de 5 a 10 minutos, seguido por 3 enjuagues en agua esterilizada (Castillo, 2004).

2.7. Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y asépticos. El éxito está determinado por la edad de la planta donante, la edad fisiológica, el estado de desarrollo y el tamaño del explante. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantes (Olmos, Luciani y Galdeano, s/f).

Orellana (1997), citado por Recalde (2017), considera que en esta etapa es muy común emplear medios de cultivos diluidos y libres de reguladores de crecimiento. Los principales problemas que aparecen en esta etapa son las contaminaciones tanto endógenas como exógenas y la oxidación fenólica. El cultivo se considera establecido cuando el explante y/o tejido están vivos y aparentemente libre de contaminación.

Para la elaboración de las soluciones madres se debe partir del medio base Murashige y Skoog, se encuentran agrupadas de acuerdo a las necesidades de nutrientes de las plantas (macro y micro nutrientes, hormonas, vitaminas, etc.).

Aunque actualmente se cuenta con una literatura detallada de técnicas de cultivos vegetales in vitro, con los protocolos correspondientes a muchas especies vegetales, existen especies en las cuales el establecimiento, multiplicación y/o enraizamiento de los cultivos es dificultoso y se requiere una intensa tarea

experimental para lograr su micropropagación o para obtener callos o suspensiones capaces de producir los metabolitos deseados (Ortega, 2010).

Los medios nutritivos para el cultivo de células y tejidos vegetales son, en general, menos complejos que los de cultivos microbianos y son formulados en forma más o menos empírica. Si bien se desarrollan periódicamente nuevas fórmulas comerciales, no existe hasta el presente un diseño racional que tenga en cuenta la composición centesimal de la célula vegetal y el conjunto de condiciones que controlan el crecimiento y la diferenciación (Ortega, 2010).

No obstante, normalmente se puede utilizar un medio sencillo y complementarlo con diferentes componentes y reguladores de crecimiento para llegar empíricamente a la fórmula que le brinde al tejido las mejores condiciones para su crecimiento y producción. Se han descrito un gran número de medios nutritivos para el cultivo de vegetales in vitro. Estos medios de cultivo constan de sales minerales, vitaminas, aminoácidos, azúcares y reguladores de crecimiento (Ortega, 2010).

La composición mineral se define en forma precisa en cada uno de los medios y está dada tanto por los macroelementos (N, P, K, S, Mg y Ca) como por los microelementos (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I y Fe). Estos nutrientes deben estar en una concentración tal que permita el adecuado crecimiento celular. Los requerimientos de nitrógeno son generalmente provistos por una mezcla de nitrato y amonio en concentraciones variables entre 3 y 50 mg. Cuando estas fuentes son

suplementadas en forma individual se afectan, generalmente en forma negativa, tanto el crecimiento del cultivo como la producción de metabolitos. Pero, dado que el uso de nitrato exige una mayor demanda energética para la asimilación del nitrógeno si se compara con el amonio, algunos explantos crecen mejor si se les suministra nitrógeno reducido, recomendándose en este caso la adición de un ácido orgánico como el succinato como agente bufferante, se presentan ejemplos de la influencia de las concentraciones de nitrato y amonio sobre la producción de metabolitos secundarios. Muchas células vegetales son sensibles a los niveles de fosfatos en el medio. Precisamente. Habitualmente, los fosfatos son almacenados en la vacuola y adquiridos desde allí para el crecimiento, mientras que la síntesis de metabolitos comienza al agotarse el fosfato vacuolar. La concentración necesaria de fosfato indicada en los diferentes medios de cultivo varía entre 0,1 y 1,5 mm. Generalmente se agrega calcio en mayores concentraciones que en los medios microbianos, variando entre 1 y 3 mm. El hierro es esencial para el crecimiento celular y se agrega al medio de cultivo en una concentración de 0,01 a 0,15 mm. Se aconseja la utilización del quelato Fe-EDTA que aumenta la solubilidad del hierro. La naturaleza y concentración de los micronutrientes empleados en los medios de cultivo surgen principalmente de resultados empíricos al evaluar la capacidad de cada elemento de afectar el crecimiento. En general el boro, el manganeso, el yodo y el cinc se utilizan en concentraciones variables entre 1 y 100 mm, mientras que el resto de los micronutrientes se agregan en valores inferiores a 0,1 mm. No hay un estudio sistemático de su influencia en el crecimiento y la productividad, aunque

existen varios trabajos puntuales como los referidos a la estimulación de la producción de shikonina al aumentar 30 veces el ión cobre (Ortega, 2010).

Las vitaminas favorecedoras del desarrollo de cultivos in vitro y que se añaden rutinariamente en la mayoría de los medios de cultivo son: tiamina (B1), piridoxina (B6) y ácido nicotínico (Krikorian, 1991). Otras vitaminas que suelen ser útiles son ácido pantoténico, biotina, riboflavina (B2), colina, cianocobalamina (B12) y ácido fólico. El ácido ascórbico (vitamina C) se considera benéfico en algunos casos, pero probablemente debido más a su capacidad reductora que a su papel como vitamina (Ortega, 2010).

Otro compuesto orgánico que promueve el crecimiento de algunos cultivos es el mio-inositol, que está involucrado en la síntesis de fosfolípidos y por lo tanto de sistemas de membranas. En general se utiliza en una concentración 0,5 mm. El papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y células vegetales es complejo, ya que los tejidos responden en forma diversa a su suplemento. En general, si los aminoácidos corresponden a la forma D son inhibidores, mientras que en la forma L tienen acción benéfica. Debido a que las células cultivadas in vitro son generalmente heterotróficas respecto de la fuente de carbono, se deben agregar azúcares al medio de cultivo. Estos actúan como fuente energética y de carbono e incrementan el potencial osmótico del medio. La sacarosa, en concentraciones del 2 al 4 % (p/v), constituye la fuente más utilizada. Otros azúcares capaces de sostener el crecimiento o incrementar la producción de metabolitos son glucosa, fructosa, trehalosa, maltosa y lactosa. Varios investigadores han estudiado la influencia de la

fuentes de carbono en el crecimiento y la producción, observando que el nivel de azúcar puede influenciar a ambos pero no siempre es previsible su efecto. En general, el incremento de los niveles de sacarosa favorece el crecimiento y la formación de productos, pero valores superiores al 10 % (p/v) pueden producir represión por catabolitos. Aunque la composición del medio de Murashige-Skoog da buenos resultados en el cultivo in vitro de la mayoría de las especies, se debe seleccionar una combinación de nutrientes en función del conocimiento de la fisiología de la especie, de los resultados experimentales obtenidos, del tipo de cultivo a desarrollar (plántulas, callos, raíces, meristemas, embriones) o del objetivo del trabajo (crecimiento, diferenciación u obtención de metabolitos). Los reguladores de crecimiento son componentes exclusivos de los medios de cultivos vegetales. El pH inicial de los medios de cultivo se regula, en general, a pH 5,7 dado que afecta tanto el crecimiento como la producción (Ortega, 2010).

Orellana (1997), citado por Recalde (2017), menciona que el estado de desarrollo de la planta madre y la edad fisiológica del explante, así como su tamaño, son de gran influencia en el éxito del cultivo in vitro. El tamaño del explante es otro factor que influye ya que mientras más pequeño es el explante menor el riesgo de contaminación. Para la eliminación de microorganismos contaminantes los explantes son desinfectados superficialmente. Generalmente se cortan los explantes de un tamaño algo superior y son sometidos a la acción de los desinfectantes y luego en condiciones estériles son reducidos a su tamaño final.

La iniciación del crecimiento implica el rompimiento de la latencia de las yemas laterales, hecho que se ve favorecido por la presencia de sustancias inductoras como las auxinas y citoquinas.

2.8. Propagación *in vitro*

Lynch (1999), citado por Cano (2013), menciona que el objetivo principal de esta etapa es incrementar el número de propágulos (es decir, de unidades individualizables con las que se pueda repetir el proceso de regeneración) por explante. Existen diferentes rutas para la multiplicación de plántulas; sin embargo, cuando la finalidad principal es la conservación *in vitro* es casi obligado recurrir a la proliferación a partir de meristemas o yemas ya existentes, ya que con este tipo de explantes es altamente probable que se mantenga la fidelidad genética de la especie en cuestión a lo largo de todo el proceso de micropropagación. Aun así, no todos los brotes que se forman en un cultivo de este tipo se originan a partir de yemas axilares. Puede darse la aparición de brotes adventicios que surgen directamente del tejido del brote inicial o indirectamente del callo de la base del mismo.

Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones

bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica (Krikorian y Cronauer, 1984).

La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo (Krikorian y Cronauer, 1984).

La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago, esto último generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis (Krikorian y Cronauer, 1984).

Trujillo (2004), citado por Recalde (2017), indica que la técnica de multiplicación que se utilice y el rendimiento de la propagación, pueden tener consecuencias en las siguientes etapas y en su comportamiento ex vitro. Una de las posibles consecuencias de una técnica inapropiada de multiplicación es la variabilidad genética que puede estar ocasionada por el uso de citoquininas inapropiadas o un alto nivel de las mismas.

Las condiciones culturales en las cuales crece el explante son el resultado de la interacción de tres factores: el estado del explante o material vegetal, determinado en parte por el medio de cultivo, el recipiente de cultivo y el ambiente externo o condiciones de crecimiento del cuarto de cultivo. La capacidad de respuesta de los

explantes a un mismo medio de cultivo cambia con el número de subcultivos, el tipo de explante subcultivado y el método del repique. Por, esto mismo, el medio de cultivo debe optimizarse a fin de lograr la mayor tasa de multiplicación vegetativa. Comúnmente se emplea como medio basal el medio MS completo, suplementado con 3% de sacarosa como fuente de carbono. A este medio se le adicionan además, reguladores de crecimiento, tanto del tipo de auxinas como de citocininas (Olmos, Luciani y Galdeano, s/f).

Según Toro (2004), citado por Recalde (2017), la eficiencia del método de multiplicación aumenta cuando los cultivos son homogéneos ya que hacen más sencilla su manipulación a la hora de repicarlo, los principales problemas que pueden aparecer en esta etapa son la vitrificación y la presencia de contaminantes, generalmente por causa de contaminaciones endógenas que no se han eliminado en la etapa anterior, o por mal manejo del material.

2.9. Enraizamiento y aclimatación

Según Orellana (1997), citado por Recalde (2017), menciona que en esta etapa consiste en lograr que los brotes se elonguen y formen su sistema radical al mismo tiempo, para facilitar su adaptación al medio externo. Existen muchos factores químicos y físicos que favorecen el enraizamiento in vitro. El estrés hídrico, la alta temperatura, la baja intensidad de luz y el uso de carbón activado son factores físicos que estimulan el enraizamiento.

Según Villalobos y Thorpe (1991), citado por Recalde (2017), indica que mientras que en un ambiente químico favorable al desarrollo de raíces puede lograrse mediante la reducción en la concentración de sales minerales del medio de cultivo, o bien, mediante el incremento de ciertos elementos menores (Br, Ca y Mn) o por la adición de algunos fenoles y vitamina D. Así mismo, se requiere un balance hormonal adecuado dirigido al aumento en auxinas exógenas.

Sarasan et al., (2006), citado por Cano (2013), indican que el uso de citoquininas en la etapa de multiplicación de los brotes inhibe con frecuencia la formación de raíces, lo que refuerza la necesidad de una etapa de elongación en la que los explantes están en un medio ya sin reguladores. A partir de aquí, el enraizamiento de explantes in vitro suele ser dependiente de la adición al medio de auxinas. El descubrimiento de la producción de raíces adventicias en esquejes en respuesta a la aplicación de auxina data de 1930 y sigue siendo hoy en día la estrategia más utilizada para el enraizamiento. Sin embargo; el enraizamiento puede ser particularmente problemático para especies leñosas cultivadas in vitro.

La aclimatación de plantas producidas por cultivo de tejidos es una de las etapas más importantes en la micropropagación.

Segovia y Laing. (1991), citador por Recalde. (2017), indica que la aclimatación consiste en la adaptación de las plántulas cultivadas in vitro a las nuevas condiciones del ambiente exterior, las plantas enraizadas in vitro presentan varias características peculiares que dificultan su adaptación al medio externo una

vez concluido el período de cultivo. Entre estas características se encuentran: la alta humedad relativa dentro de los recipientes que provoca que las plantas generadas in vitro carezcan de algunos de los sistemas normales para evitar la pérdida de agua (la cutícula está poco desarrollada y el mecanismo de cierre de los estomas está atrofiado).

La manera en la que se transfieren las plantas desde el ambiente in vitro a condiciones ex vitro condiciona enormemente el éxito del proceso completo de la micropropagación. Existen dos razones básicas por las que esta etapa debe ser realizada con sumo cuidado:

- Riesgo de estrés hídrico severo. Ya que las plantas se han desarrollado in vitro en un microambiente en el que la humedad relativa es prácticamente del 100%, sus estomas suelen ser atípicos y su cierre es incompleto bajo condiciones de baja humedad relativa. De esta manera, este tipo de plantas pierden agua de forma rápida cuando son transferidas a condiciones ex vitro.

- Adaptación nutricional y fotosintética. Las plantas micropropagadas no dependen por completo de su propia fotosíntesis, ya que se les ha suministrado sacarosa (u otro azúcar) y han sido mantenidas en condiciones de baja intensidad luminosa, lo que las hace también susceptibles a daños fotooxidativos (Cano, 2013).

Sarasan et al., (2006), citado por Cano (2013), indica que para el caso de las musáceas, 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 bolsas de polietileno de color negro, con suelo de adecuada textura (sustrato), inicialmente las plantas requieren de una alta humedad relativa y deben colocarse, durante las primeras tres semanas, en un ambiente húmedo y con un 75% de sombra. En estas condiciones la hoja número uno inicia su emergencia ocho días después de haberse realizado el trasplante. El follaje que la planta desarrolla in vitro es transicional y las hojas tienden a atrofiarse. El ritmo de emisión foliar es de aproximadamente una hoja cada ocho días. Una práctica que favorece notablemente el desarrollo y la adaptación de las plantas, es la aplicación foliar a los 15 y 30 días después de realizado el transplante de una solución acuosa preparada con los macro y micronutrientes de Murashige y Skoog.

Según Bonga y Aderkas (1992), citado por Recalde (2017), menciona que las plantas generadas no realizan una fotosíntesis normal, ya que sus requerimientos de carbono son satisfechos por el medio de cultivo, por lo que la anatomía de las hojas difieren de las plantas que crecen in vivo, siendo más delgadas y con menor contenido de clorofila. Por lo tanto, es necesario desarrollar en forma paulatina su autotrofía, para adaptarlas al medio externo con éxito. Como son cultivos libres de patógenos, las plantas no han activado sus mecanismos de resistencia naturales, por lo que es recomendable trabajar en las condiciones más higiénicas posibles.

Las plantas micropropagadas generalmente son susceptibles al transplante debido a que en condiciones in vitro ellas son mixotróficas en su modo de nutrición, aparentemente alternan entre el uso de carbohidratos y la fijación de CO₂. El uso de

carbohidratos es estimulado por la presencia de altas concentraciones de azúcar y de reguladores de crecimiento en el medio de cultivo y las bajas intensidades de luz durante el período de incubación. En estas condiciones, el control de la humedad y la necesidad de irrigación es mucho más exigente, es por esto que cuando un gran número de plantas es aclimatado, es necesario establecer un buen sistema de nebulización; pero cuando son pequeños grupos, pueden utilizarse los “mini invernaderos”, o el uso de bolsas plásticas. En algunos casos se han utilizado antitranspirantes, los cuales no han sido exitosos debido a problemas de fitotoxicidad e interferencia con la fotosíntesis.

La etapa de adaptación en el invernadero se extiende hasta los 60 días y las plantas presentan una altura promedio alrededor de los 17 cm y unas 6 hojas nuevas. Si se sigue estos procedimientos el porcentaje de supervivencia alcanza entre un 95 y 100%. Una vez transcurrido esta etapa, las plantas pueden trasladarse al lugar definitivo de siembra en el campo (Sandoval, Brenes y Pérez, 1991).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Babahoyo; ubicado en las coordenadas geográficas 79° 32' longitud Oeste y 01° 49' de latitud Sur; en el Km 7,5 de la vía Babahoyo – Montalvo, provincia de Los Ríos; a 8.0 msnm, con una precipitación promedio anual de 2329,8 mm; humedad relativa de 82%; heliofanía de 998.2 horas luz y temperatura de 25.6 °C.¹

3.2. Material genético

Se utilizaron ápices meristemáticos de 11 cultivares de musáceas de genomas AA, AAA, AAB, como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Lista de los 11 cultivares de musáceas de genomas AA, AAA, AAB utilizados en el experimento.

VARIEDAD	TIPO	GENOTIPO
ORITO	BANANO	AA
GRAN WILLIAMS	BANANO	AAA
GRAND NAINÉ	BANANO	AAA
GROS MICHEL	BANANO	AAA
GUINEO MORADO	BANANO	AAA
VALERY	BANANO	AAA
BARRAGANETE	PLÁTANO	AAB
DOMINICO	PLÁTANO	AAB
DOS RACIMOS	PLÁTANO	AAB
LIMEÑO	PLÁTANO	AAB
MAQUEÑO	PLÁTANO	AAB

¹ Datos obtenidos de la Estación Agrometeorológica de la Universidad Técnica de Babahoyo.

3.3. Factor estudiado

Los factores en estudio, fueron dos protocolos para el establecimiento *in vitro* de 11 musáceas.

3.4. Tratamientos estudiados

TRATAMIENTOS	FASE	ÓRGANO	CONDICIÓN	TIEMPO	SOLUCIÓN
1	Desinfección	cormo	Refrigeración	5 horas	Ácido ascórbico al 0,02%
	Desinfección	cormo	Cámara de Flujo laminar	1 minuto	En Alcohol al 96%
	Desinfección	cormo	Cámara de Flujo laminar	10 minutos	Ca(ClO) ₂ al 3%
	Desinfección	cormo	Cámara de Flujo laminar	5 minutos	Agua destilada estéril
	Desinfección	cormo	Cámara de Flujo laminar	5 minutos	Agua destilada estéril
	Desinfección	cormo	Cámara de Flujo laminar	5 minutos	Agua destilada estéril
	Inducción	meristemo	Cámara de Flujo laminar	5 minutos	Ácido ascórbico estéril al 0,02%
	Inducción	meristemo	Cuarto Oscuro	8 días	30 ml de MS + sacarosa al 3% en frasco de vidrio 5 x 10 con tapa de metal
	Inducción	meristemo	Cuarto de crecimiento	45 días	30 ml de MS + sacarosa al 3% en frasco de vidrio 5 x 10 con tapa de metal
	2	Desinfección	cormo	Refrigeración	1 hora
Desinfección		cormo	Cámara de Flujo laminar	10 segundos	Alcohol al 96%
Desinfección		cormo	Cámara de Flujo laminar	15 minutos	NaClO al 2,5 %
Desinfección		cormo	Cámara de Flujo laminar	4 minutos	Agua destilada estéril
Desinfección		cormo	Cámara de Flujo laminar	4 minutos	Agua destilada estéril
Desinfección		cormo	Cámara de Flujo laminar	4 minutos	Agua destilada estéril
Inducción		meristemo	Cámara de Flujo laminar	10 segundos	Ácido ascórbico estéril al 0,02%
Inducción		meristemo	Cuarto Oscuro	10 días	10 ml de MS + glucosa al 2% en tubo de vidrio 2 x 15 cm con tapa de algodón
Inducción		meristemo	Cuarto de crecimiento	30 días	30 ml de MS + glucosa al 2% en frasco de vidrio 5 x 10 cm con tapa de metal

3.5. Métodos

Se utilizaron los métodos: Inductivos-Deductivos, Deductivos-Inductivos y el método experimental.

3.6. Diseño experimental

El experimento fue establecido en un Diseño Completamente al Azar (DCA) con desigual número de repeticiones.

3.7. Manejo del experimento

El experimento consistió en colectar, desinfectar y establecer in vitro once accesiones de musáceas en dos protocolos de inducción.

Se colectaron hijuelos de 1 metro de altura aproximadamente, considerando que las plantas madres estén en condiciones fitosanitarias óptimas y se utilizaron los cormos como fuente de explante para obtener los ápices meristemáticos (Figura 1, A), los cormos se redujeron a un tamaño aproximado de 5 x 5 centímetros (Figura 1, B, C), inmediatamente se sumergieron en una solución antioxidante (200 mg de ácido ascórbico /L agua) contenida en un frasco de vidrio 400 mL de volumen, con 250 mL de la solución y se conservaron en refrigeración por 1 o 5 horas (dependió del protocolo), hasta iniciar el proceso de desinfección (Figura 1, D),

Luego, los cormos mantenidos en la solución antioxidante se llevaron hacia la cámara de flujo laminar para proceder a la desinfección en condiciones asépticas. En cámara se procedió a desinfectar, sumergiendo los cormos en alcohol al 96 %

durante 10 segundos y 1 minuto (de acuerdo a los dos protocolos) en constante agitación (Figura 2, A), se retiró el alcohol y seguido se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5 % durante 10 minutos o hipoclorito de calcio al 3% por 15 minutos (Figura 2, B), luego se realizaron 3 enjuagues con agua destilada estéril con una duración de 4 o 5 minutos de acuerdo a los dos protocolos utilizados para eliminar residuos de los desinfectantes (Figura 2, C).

La inducción consistió en cultivar in vitro los ápices meristemáticos contenidos en la parte central de los cormos, luego en la cámara de flujo laminar se procedió a extraer el ápice meristemático ubicado en la parte central del cormo utilizando pinzas y bisturíes sobre una hoja de papel (reciclado) estéril (Figura 3, A). Se retiraron las vainas hasta dejar el meristemo de aproximadamente 3 cm de longitud (Figura 3, B), para luego fueron sembrados en forma vertical sobre el medio de inducción (30 mL) Murashige y Skoog (M&S) modificado, en frascos de vidrio de 6 cm de diámetro x 10 cm de altura con tapa de metal (Figura 3, C).

Luego los frascos conteniendo los meristemas fueron colocados en un lugar oscuro durante 8 días para promover división celular y evitar oxidación (Figura 3, D), y posteriormente se llevaron a las perchas acondicionadas con luz hasta a romper dominancia apical.

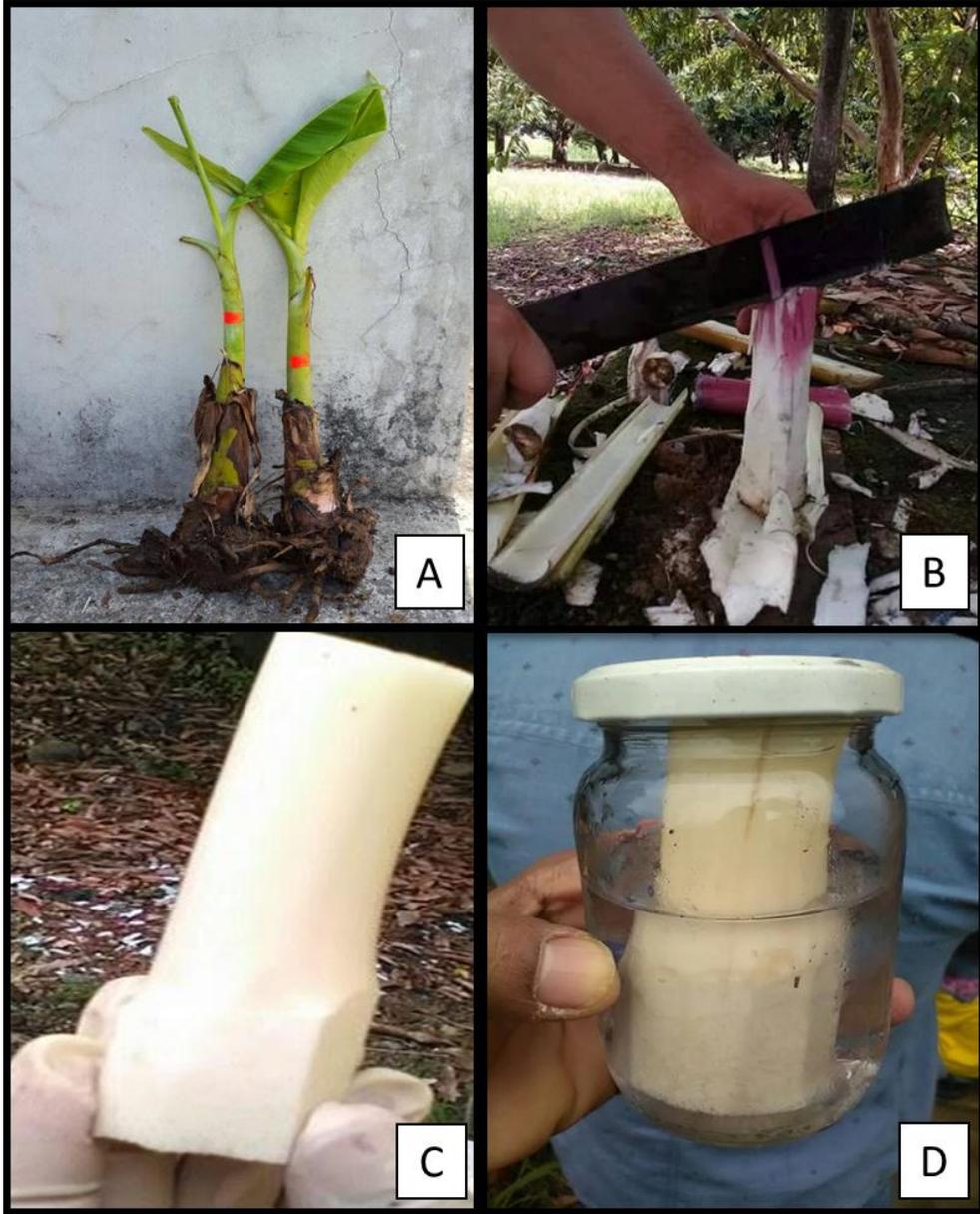


Figura 1. Selección y reducción del corno: hijuelo de 1 metro de altura aproximadamente (A); reducción del corno (B); corno reducido a 5x5 cm (C); corno sumergido en ácido ascórbico (D).



Figura 2. Desinfección del corno: cormos introducidos en alcohol (A); corno introducido en cloro (B); corno en enjuagues con agua destilada esterilizada (C).

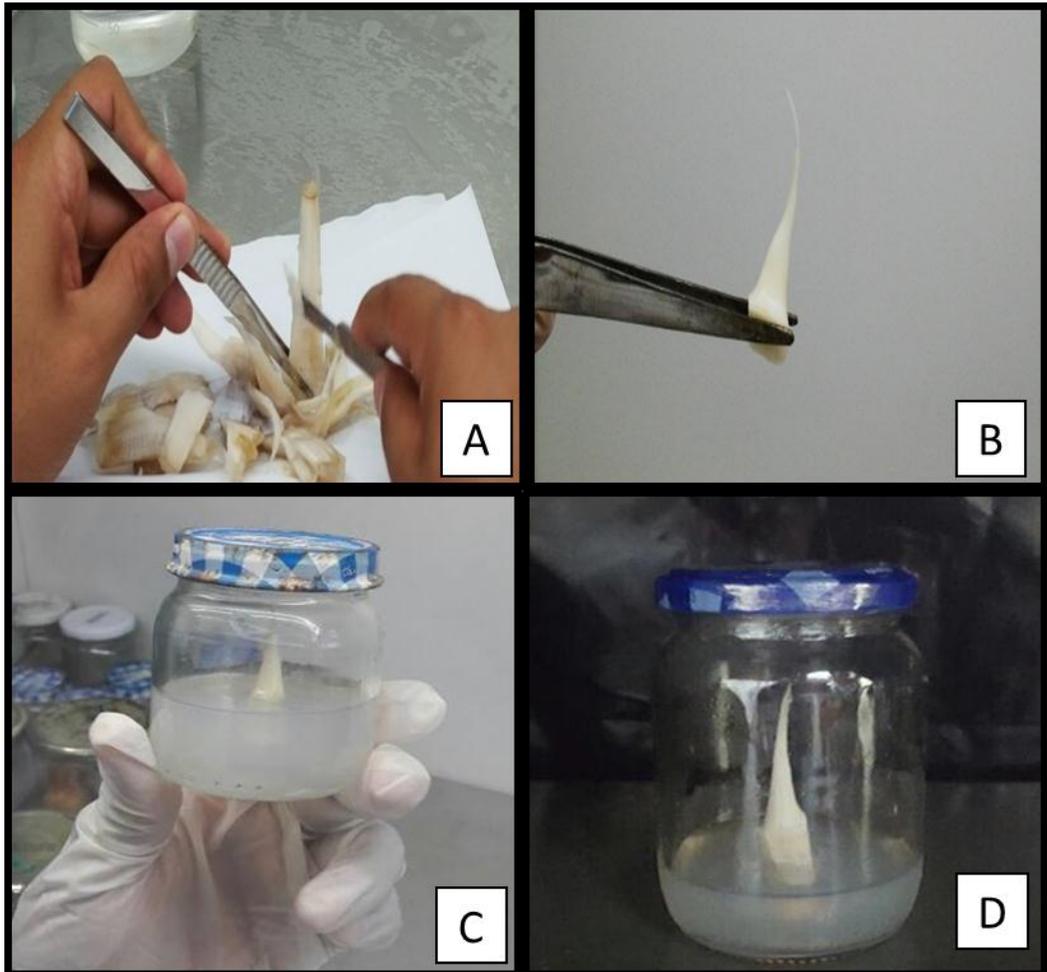


Figura 3. Siembra *in vitro* de los ápices meristemáticos: extracción del ápice meristemático (A); ápice meristemático de 3 cm listo para la siembra (B); ápice meristemático sembrado en medio de inducción (C); ápice meristemático en cuarto oscuro (D).

3.8. Variables evaluadas

3.8.1. Contaminación de explantes

Se determinó el porcentaje de ápices meristemáticos contaminados de cada una de las musáceas cultivadas *in vitro* en los dos protocolos de inducción.

3.8.2. Fenolización de explantes

Se determinó el porcentaje de ápices meristemáticos fenolizados de cada una de las musáceas cultivadas *in vitro* en los dos protocolos de inducción.

3.8.3. Establecimiento de los explantes

Se determinó el porcentaje de ápices meristemáticos establecidos de cada una de las musáceas cultivadas *in vitro* en los dos protocolos de inducción.

Además, se agruparon los cultivares por genotipo Banano y Plátano y se evaluó su comportamiento aplicando los tratamiento 1 y 2.

IV. RESULTADOS

4.1. Contaminación de explantes

En lo que respecta la variable de contaminación, se observa que el tratamiento 2 presenta cero explantes contaminados, a diferencia del tratamiento 1, que tiene un mayor número de explantes contaminados presentando una media de 36 %. El análisis estadístico demuestra que el tratamiento 2, es significativamente diferente al tratamiento 1 (Tabla 2 – Figura 4).

Tabla 2. Contaminación de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología, FACIAG – UTB. Los Ríos, Babahoyo - Ecuador, 2017.

Tratamientos	Medias (%)	Rangos	Comparación
2	0	7	A
1	36	16	B

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

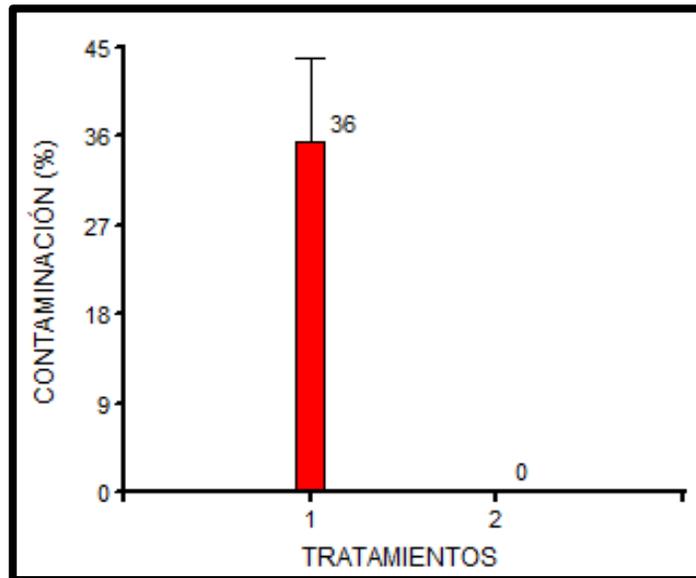


Figura 4. Contaminación de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG - UTB - Ecuador, 2017.

4.2. Fenolización de los explantes

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta variable, se observa que el tratamiento 2 presentó el menor número de explantes fenolizados con una media de 10%, a diferencia del tratamiento 1 que tiene un mayor número de explantes fenolizados, presentando una media de 37%. El análisis estadístico demuestra que el tratamiento 2, es significativamente diferente al tratamiento 1 (Tabla 3 – Figura 5).

Tabla 3. Fenolización de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG – UTB. Los Ríos, Babahoyo - Ecuador, 2017.

Tratamientos	Medias (%)	Rangos	Comparación
2	10	9	A
1	37	15	B

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

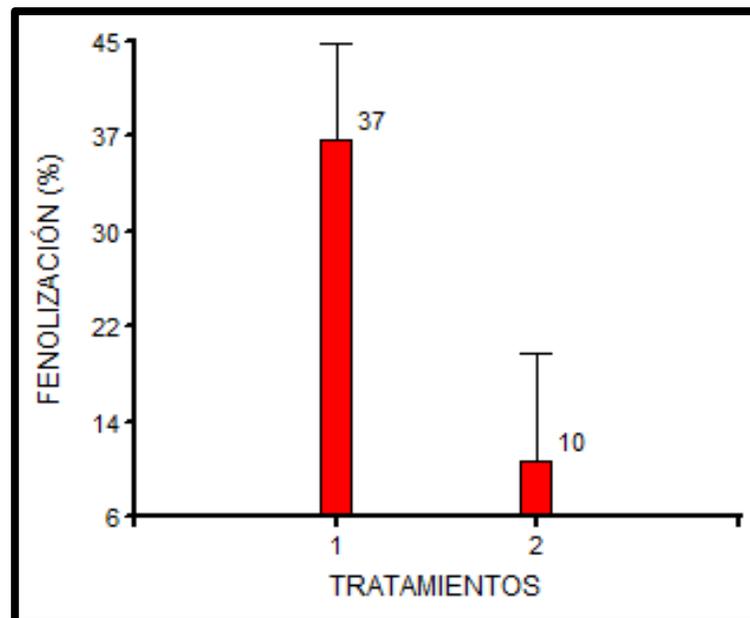


Figura 5. Fenolización de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología de la FACIAG - UTB - Ecuador, 2017.

4.3. Establecimiento de los explantes

De acuerdo al análisis estadístico, se observa que el tratamiento 2 presentó el mayor número de explantes establecidos, presentando una media de 90%, a diferencia del tratamiento 1 que tiene el menor número de explantes establecidos, presentando una media de 27%. El análisis estadístico demuestra que el tratamiento 2 es significativamente diferente al tratamiento 1 (Tabla 4 – Figura 6).

Tabla 4. Establecimientos de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG – UTB. Los Ríos, Babahoyo - Ecuador, 2017.

Tratamientos	Medias (%)	Rangos	Comparación
1	27	7	A
2	90	16	B

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

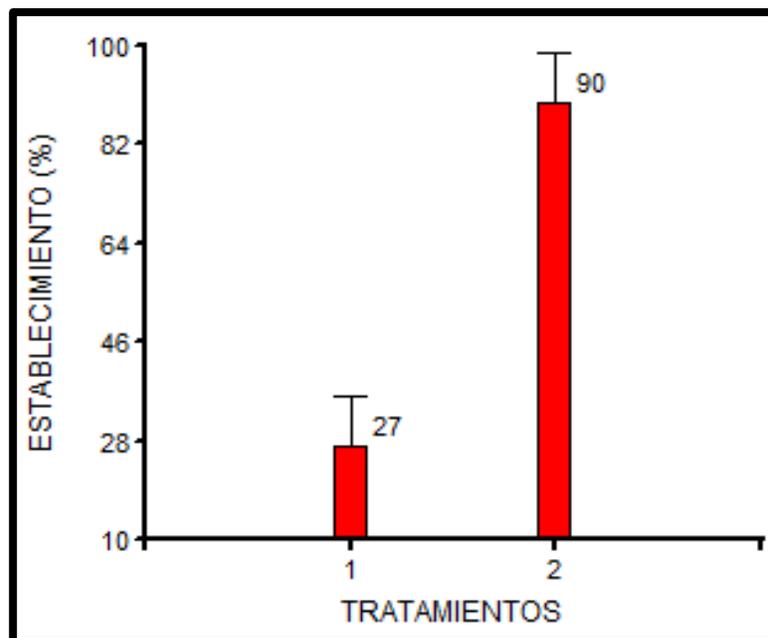


Figura 6. Establecimiento de explantes evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG - UTB - Ecuador, 2017.

Usando el tratamiento 1 en los cultivares de banano, los valores nos muestran que de 22 explantes sembrados, 7 explantes se contaminaron, 10 explantes se fenolizaron y 5 explantes quedaron establecidos. Usando el mismo tratamiento para los cultivares de plátano se obtuvo los siguientes resultados, explantes sembrados 20, explantes contaminados 6, explantes fenolizados 8 y explantes establecidos 6, como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Evaluación del tratamiento 1, de los cultivares de Banano y Plátano evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG – UTB. Los Ríos, Babahoyo - Ecuador, 2017.

TRAT	TIPO	VARIEDAD	SEBRADOS	CONTAMINADOS	FENOLIZADOS	ESTABLECIDOS
1	BANANO	ORITO	4	0	3	1
1	BANANO	GRAN WILLIAMS	2	2	0	0
1	BANANO	GRAND NAINÉ	6	2	4	0
1	BANANO	GROS MICHEL	6	2	2	2
1	BANANO	GUINEO MORADO	2	0	0	2
1	BANANO	VALERY	2	1	1	0
1	PLÁTANO	BARRAGANETE	6	1	3	2
1	PLÁTANO	DOMINICO	6	2	2	2
1	PLÁTANO	DOS RACIMOS	4	1	2	1
1	PLÁTANO	LIMEÑO	2	1	0	1
1	PLÁTANO	MAQUEÑO	2	1	1	0

Usando el tratamiento 2 en los cultivares de banano, los valores nos muestran que de 25 explantes sembrados, se obtuvo cero explantes contaminados, 1 explante fenolizados y 24 explantes establecidos. Usando el mismo tratamiento para los cultivares de plátano se obtuvo los siguientes resultados, explantes sembrados 12, explantes contaminados 0, explantes fenolizados 1 y explantes establecidos 11, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Evaluación del tratamiento 2, de los cultivares de Banano y Plátano evaluados en el experimento. Laboratorio de Biotecnología en la FACIAG – UTB. Los Ríos, Babahoyo - Ecuador, 2017.

TRAT	TIPO	VARIEDAD	SEMBRADOS	CONTAMINADOS	FENOLIZADOS	ESTABLECIDOS
2	BANANO	ORITO	2	0	0	2
2	BANANO	GRAN WILLIAMS	1	0	0	1
2	BANANO	GRAND NAINÉ	8	0	0	8
2	BANANO	GROS MICHEL	7	0	1	6
2	BANANO	GUINEO MORADO	4	0	0	4
2	BANANO	VALERY	3	0	0	3
2	PLÁTANO	BARRAGANETE	6	0	0	6
2	PLÁTANO	DOMINICO	2	0	0	2
2	PLÁTANO	DOS RACIMOS	1	0	0	1
2	PLÁTANO	LIMEÑO	1	0	1	0
2	PLÁTANO	MAQUEÑO	2	0	0	2

En la Figura 7, se observan los explantes contaminados, fenolizados y establecido, como resultados del experimento.

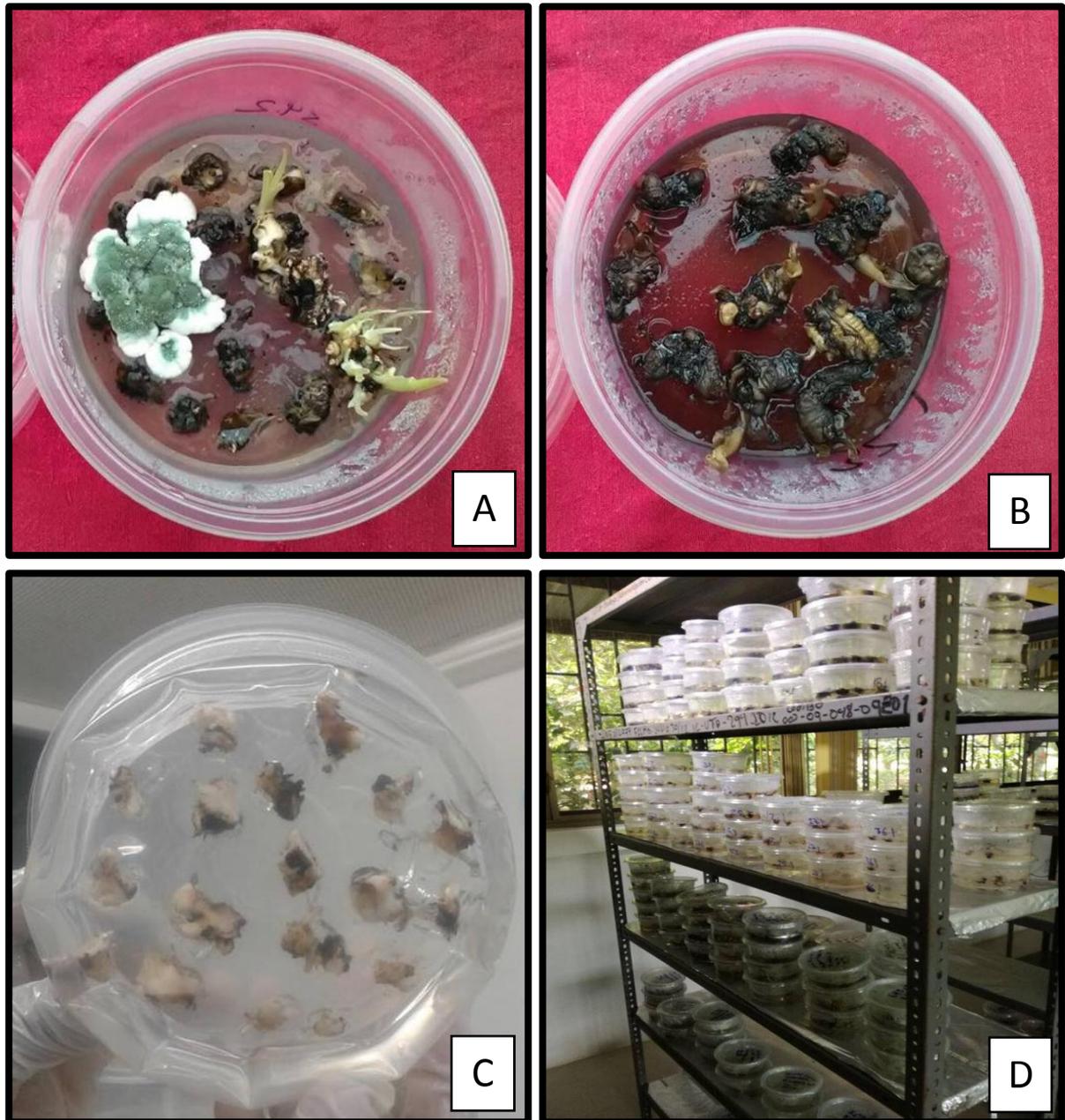


Figura 7. Explantes contaminados (A); explantes fenolizados (B); explantes establecidos (C) y (D).

V. DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, se determinó que el tratamiento 2 en lo que respecta a contaminación, obtuvo un menor porcentaje de explantes contaminados debido probablemente a la concentración de hipoclorito de sodio. 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.

En relación a fenolización (oscurecimiento de las paredes del explante), se consiguió mostrar medias de entre 10% como mínimo y un máximo de 37% de explantes fenolizados. Este estudio se reporta solo lo relacionado con el establecimiento del explante en el medio de inducción. Sin embargo; según lo indicado por Gutiérrez (1996) el ennegrecimiento de los explantes se puede disminuir a medida que se aumenta el número de sub cultivos, ya que se van eliminando los tejidos necróticos durante el proceso.

En relación a la variable establecimiento de los explantes, se pudo determinar mediante el análisis estadístico que el tratamiento 2 presentó el mayor porcentaje de explantes viables y bajo porcentaje de explantes contaminados, presentando una media del 90% de explantes establecidos a diferencia del tratamiento 1 que presentó un bajo porcentaje de explantes establecidos, con una media del 27%. Esto concuerda con lo escrito por Ríos *et al.*, (2013), que mencionan que en la etapa de establecimiento en plátano, se obtuvo un alto porcentaje de explantes viables y

bajo porcentaje de explantes contaminados a la octava semana de cultivo, presentando un alto porcentaje de explantes viables (80%).

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye lo siguiente:

- El tratamiento más adecuado para evitar la oxidación y contaminación en la fase de desinfección fue el tratamiento 2, el cual incluye varios procedimientos.
- Con el tratamiento 2 se obtuvieron los más bajos porcentajes de contaminación (0%), y fenolización (10 %) y el más alto porcentaje de establecimiento (90%).
- Usando el tratamiento 1 en los cultivares de banano, se logró establecer 5 explantes. Usando el mismo tratamiento para los cultivares de plátano se logró establecer 6 explantes.
- Usando el tratamiento 2 en los cultivares de banano, se logró establecer 24 explantes establecidos. Usando el mismo tratamiento para los cultivares de plátano se logró establecer 11 explantes.

6.2. RECOMENDACIONES

- Considerar el tratamiento número 2, debido a que este sobresalió por tener porcentaje superior de explantes establecidos en el laboratorio.
- Utilizar material vegetal juvenil el cual facilita la fase de desinfección, así como también mejora el establecimiento *in vitro*.

VII. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Babahoyo, ubicada en el km 7 1/2 de la vía Babahoyo – Montalvo. Consistió en el establecimiento in vitro de musáceas (AA, AAA, AAB) vía organogénesis directa.

Los objetivos de este estudio fueron; establecer in vitro 11 accesiones de musáceas de genomas AA, AAA, AAB y evaluar el establecimiento de los explantes en dos protocolos de inducción.

Durante el desarrollo de esta investigación se realizó el debido proceso que consistió en coleccionar, desinfectar y establecer in vitro once accesiones de musáceas de diferentes especies en dos protocolos de inducción.

Las variables agronómicas evaluadas fueron: Contaminación de explantes, fenolización de explantes, y establecimiento de los explantes. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con desigual número de repeticiones. Las variables fueron analizadas por medio de estadística no paramétrica mediante la prueba de Kruskal-Wallis, utilizando el software estadístico InfoStat.

Los resultados mostraron que el tratamiento 2 sobresalió en comparación con el tratamiento 1, por presentar un protocolo más óptimo para el establecimiento in vitro de musáceas, obteniéndose un 100% de explantes libre de contaminación. En conclusión, el tratamiento 2 presentó los más bajos porcentajes de contaminación

(0%), y fenolización (10 %) y el más alto porcentaje de establecimiento de los explantes (90%).

VIII. SUMMARY

This research was carried out in the Faculty of Agricultural Sciences of the Technical University of Babahoyo, located at km 7 1/2 of the Babahoyo - Montalvo road. It consisted of the in vitro establishment of musaceae (AA, AAA, AAB) via direct organogenesis.

The objectives of this study were: To establish in vitro 11 accessions of musa from AA, AAA, and AAB genomes and to evaluate the establishment of the explants in two induction protocols.

During the development of this research, the due process consisted in collecting, disinfecting and establishing in vitro eleven accessions of musaceae of different species in two induction protocols.

The agronomical variables evaluated were: Contamination of explants, Phenolization of explants, and establishment of explants. A Completely Random Design (DCA) was used with uneven number of repetitions. The variables were analyzed using non-parametric statistics using the Kruskal-Wallis test, applying the statistical software InfoStat.

The results showed that the treatment 2 excelled compared to treatment 1, because it presented a more optimal protocol for the in vitro establishment of musaceae, obtaining 100% of explants free of contamination. In conclusion, treatment 2 had the lowest percentages of contamination (0%), phenolization (10%) and the highest percentage of establishment of the explants (90%).

IX. LITERATURA CITADA

Abdelnour E. A., & Escalant, J. V. (1994). Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales. P.2. Disponible en:

http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/888/Conceptos_basicos_del_cultivo_de_tejidos_vegetales.pdf?sequence=1

AEBE. (2010). Asociación de exportadores de banano del Ecuador. La industria bananera Ecuatoriana. Guayaquil, EC, 18.

Álvarez, W. (2014). Propagación vegetativa de banano (*Musa paradisiaca*) variedad Cavendish con la aplicación de brasisteroide en diferentes concentraciones en el cantón Buena Fe (tesis de pregrado). Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. Disponible en: <http://repositorio.uteq.edu.ec/bitstream/43000/490/1/T-UTEQ-0031.pdf>

Ancasi, G; Montero, J; Ferreira, N; y Muñoz, I. (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. Vol. 7. pp. 104-111. Recuperado de: http://www.scielo.org.bo/pdf/jsars/v7n2/v7n2_a08.pdf

Angarita, A. y Perea, M. (1984). Avances del proyecto “Estudios orientados al control de la Sigatoka Negra en plátano y banano”. Segundo informe Colciencias. (Ref.1000-4-36-83). p. 60.

Angarita, A., & Perea, M. (1993). Micropropagación de plátanos y bananos. En W. M. Roca, & L. A. Mroginski, Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Capítulo 22: p. 498. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Bakry, F.; Careel, F.; Jenny, C.; y Horry, J. P. (2008). Genetic Improvement of banana. Chapter 1. In breeding plantation tree crops: Tropical species. Jain, S. M. y Priyadarshan, P. M. (Eds.). Springer Dordrecht, the Netherlands. P. 3 - 50. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169925865003>

Belalcazar, Sylvio. y Valencia J. (1991). La Planta y el Fruto. El cultivo del Plátano (*Musa* AAB Simmonds) en el Trópico. ICA. Manual de Asistencia Técnica No. 50. Feriva Ltda. Armenia, Quindío. 376 p. Disponible en: <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6678/1/067.pdf>

Berg L. A. & M. Bustamante. (1974). Heat treatment and meristem culture for the production of virus free bananas. *Phytopathology*. Vol. 64. Pp: 320-322. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A6887e/A6887e.pdf>

Calva, G., & Pérez, J. (2005). Cultivo de células y tejidos vegetales: fuente de alimentos para el futuro. UNAM (Ed.). *Revista Digital Universitaria*, 6(11): 3. Obtenido de http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/nov_art104a.pdf.

Cano, M. (2013). Aplicación de la micropropagación y criopreservación a la conservación *ex situ* de especies vegetales de interés. Tesis de posgrado. Universidad de Alicante. España. Pág. 26. Disponible en: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/35678/1/Tesis_Cano_Castillo.pdf

Castillo, A. (2004). Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Uruguay. Pág; 3. Disponible en: http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34431273/Propagacion_de_plantas_por_cultivo_in_vitro.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1497366640&Signature=iYfzu%2BT%2BSvY8z43S7znosw8iJfc%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DPropagacion_de_plantas_por_cultivo_in_vi.pdf

Gamarra, L. (2014). Regeneración *in vitro* vía organogénesis y aislamiento de protoplastos de *Gmelina arborea* a partir de plantas *in vitro*. (tesis pregrado). Pontifica Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Programa de Biología, Bogotá, Colombia. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/15436/GamarraReinosoLiesel2014.pdf?sequence=1>

Gutiérrez, J. (1996). Micropropagación *in vitro* del clon de banano (*Musa sp.*) Enano Ecuatoriano (AAA) (tesis de pregrado). Universidad Nacional

Agraria, Managua, Nicaragua. Disponible en:
<http://repositorio.una.edu.ni/1601/1/tnf02g984.pdf>

Hoyos, J., & Jaramillo, P. (2012). Caracterización física, morfológica y evaluación de las curvas de empastamiento de musáceas (*Musa spp.*). Colombia: CIRAD-PERSYST.

INIA. (2005). Estadios del Cultivo de Tejidos. En H. Prieto, M. Jordan, L. P. Barrueto, M. J. Cordeiro, & D. Durzan, Biotecnología Vegetal. Capítulo 3: p. 60. Santiago: Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA.

James, C. (2009). El Banano. Recuperado el 2 de Diciembre de 2013, de Carlos James: <http://carlosjames-carlosjames-1.blogspot.com/>

Jorge Sandoval, Gilbert Brenes, y Luis Pérez. (1991). Micropropagación de plátano y banano (*Musa* AAB, AAA) en el CATIE. Pp 14-15. Disponible en:http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/3124/Micropropagacion_de_platano_y_banano.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Krikorian, A. (1993). Propagación Clonal *in vitro*. En W. Roca, & L. Mroginski, Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Capítulo 5: p. 102. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Méndez, M. (2014). Efectos de cinco dosis de quitosano para el establecimiento *in vitro* del plátano dominico hartón (*Musa* AAB

Simmonds) en la zona de Daule (tesis pregrado). Universidad De Guayaquil, Facultad de Ciencias Agrarias, Guayaquil, Ecuador. Disponible en: [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/4756/1/MENDEZMantuano Marcel.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/4756/1/MENDEZMantuanoMarcel.pdf)

Ortega, P. (2010). Obtención de multimeristemas y callos de diferentes variedades de Banano y Plátano (*Musa spp*) a partir de meristemas apicales y scalps, (tesis pregrado), Escuela Superior Politécnica Del Litoral, Facultad de Ingeniería en Mecánica y Ciencias de la Producción, Guayaquil, Ecuador. Pág. 48. Disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/10918/4/ORTEGA%20PEREZ%20NATHALIE%20VICTORIA.pdf>

Perea, M. (2003). Biotecnología, Bananos y Plátanos. Bogotá: Guadalupe Ltda. 2003. Pág. 65.

Recalde, C. (2007). Establecimiento del cultivo *in vitro* y aclimatación en invernadero de *Nepeta Hederacea* variegata, Tabacundo – Pedro Moncayo. Tesis de pregrado. Escuela Politécnica del Ejército, Quito, Ecuador. Pág. 26. Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/1195/1/T-ESPE-014978.pdf>

Ríos, G; Añez, N; Ramírez, M; Bracho, B; Araujo, D; Suárez, H; Nava, J; (2013). Cultivo *in vitro* de yemas, tratadas con benciladenina,

provenientes de cormos enteros o seccionados de plátano "cambur manzano". Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela. Bioagro, vol. 25. Pp. 137-142. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85728427007>

Simmonds, N. W. (1962). The evolution of the bananas. Londres. Disponible en: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1047/cuf0103s.pdf>

Sofía Olmos, Gabriela Luciani y Ernestina Galdeano. (s/f). Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Pp. 353-357. Disponible en: http://www.argenbio.org/adc/uploads/Libro_INTA_II/Parte_IV.pdf

Valarezo, A. (2015). Detección temprana de mutantes de banano tolerantes o resistentes a Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) en condiciones de vivero (tesis pregrado). Universidad Técnica De Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Babahoyo, Ecuador. Disponible en: <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/1073/1/T-UTB-FACIAG-AGROP-000046.pdf>

Vargas, J. (2009). Antecedentes del Banano y/o Plátano. Recuperado el 10 de Noviembre de 2013, de monografias.com: <http://www.monografias.com/trabajos73/antecedentes-banano-platano/antecedentes-bananoplatano.shtml>.

Villalobos, V., & Thorpe, T. (1993). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En M. Roca, & L. Mroginski, Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones. Capítulo 6: p. 128. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

X. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza mediante la prueba de Kruskal -Wallis.

Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
1	11	35,61	27,91	33,33	1	10,57	0,0003
2	11	0	0	0			

Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
1	11	37,12	26,71	50	1	4,7	0,0175
2	11	10,39	30,03	0			

Tratamiento	N	Medias	D.E.	Medianas	gl	H	p
1	11	27,27	29,84	25	1	9,12	0,0014
2	11	89,61	30,03	100			